

A7

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公表

⑪ 公表特許公報 (A)

昭63-501876

⑫公表 昭和63年(1988)7月28日

⑬Int.Cl.⁴A 61 K 49/02
47/00

識別記号

3 3 0
3 4 8

府内整理番号

A-6742-4C
B-6742-4C
B-6742-4C

審査請求有

予備審査請求未請求

部門(区分) 3 (2)

(全 29 頁)

⑬発明の名称 スターバーストコンジュゲート

⑭特 願 昭62-505281

⑮⑯出 願 昭62(1987)8月18日

⑭翻訳文提出日 昭63(1988)4月18日

⑭国際出願 PCT/US87/02074

⑭国際公開番号 WO88/01178

⑭国際公開日 昭63(1988)2月25日

優先権主張 ⑬1986年8月18日⑭米国(U S)⑮897,455

⑬発明者 トマリア, ドナルド・エイ アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・ウェストチッペワリバーロード463

⑬発明者 カブラン, ドナルド・エイ アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・イーストパークドライブ919

⑬発明者 クルバー, ウィリアム・ジェイ アメリカ合衆国ミシガン州48657サンフォード・バーデンロード230

⑬出願人 ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・アボットロード・ダウセンター2030

⑬代理人 弁理士 小田島 平吉

⑬指定国 B R, D K, H U, J P, K R, N O

最終頁に続く

請求の範囲

1、少なくとも1単位の少なくとも1種の担持された製薬学的物質とアソシエーションして少なくとも1種のスターバーストポリマーを含んでなるスターバーストコンジュゲート。

2、前記スターバーストポリマーはスターバーストデンドリマーである請求の範囲第1項記載のコンジュゲート。

3、前記少なくとも1種の担持された製薬学的物質は、薬物、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反射因子、またはシグナル吸収因子である請求の範囲第1または2項記載のコンジュゲート。

4、少なくとも2種の異なる担持された物質が存在し、それらの少なくとも1種は標的ディレクターであり、そしてそれらの少なくとも1種は生物活性因子である請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。

5、前記標的ディレクターは1種または2種以上の標的レセプターに対して特異的である実在因子であり、そして前記生物活性因子は放射性核種、薬物、またはトキシンである請求の範囲第4項記載のコンジュゲート。

6、前記標的ディレクターはポリクローナル抗体またはその断片である請求の範囲第4または5項記載のコンジュゲート。

7、前記標的ディレクターはモノクローナル抗体またはその断片である請求の範囲第4または5項記載のコンジュゲート。

8、前記デンドリマーは不連続性を有する請求の範囲第1項記載のコンジュゲート。

9、式:

(P) x*(M) y

(1)

式中、各Pはデンドリマーを表わし、

xは1またはそれより大きい整数を表わし、

各Mは担持された製薬学的物質の単位を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる担持された製薬学的物質であることができ、

yは1またはそれより大きい整数を表わし、そして

*は前記担持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す。

の請求の範囲第1項記載のスターバーストコンジュゲート。

10、Mは、薬物、有害生物防除剤、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反射因子、またはシグナル吸収因子である請求の範囲第9項記載のコンジュゲート。

11、x=1でありかつy=2またはそれより大である請求の範囲第9項記載のコンジュゲート。

12、イオンのM対Pのモル比は0.1~1,000:1である請求の範囲第9項記載のスターバーストコンジュゲート。

13、薬物またはトキシンのM対Pの重量比は0.1~5:1である請求の範囲第9項記載のスターバーストコンジュゲート。

14、 (P) x*(M) y

(1)

式中、各Pはデンドリマーを表わし、xは1またはそれより大きい整数を表わし、各Mは担持された製薬学的物質の単位を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる

担持された医薬学的物質であることができ、 γ は1またはそれより大きい整数を表わし、そして $*$ は前記担持された医薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す。

を調製する方法であって、PをMと、通常適当な溶媒中で、担持された物質(M)とスターバーストデンドリマー(P)とのアソシエーションを促進する濃度において、反応させることからなる前記方法。

15、前記濃度は意温ないし過渡温度である請求の範囲第14項記載の方法。

16、前記適当な溶媒は、水、メタノール、エタノール、クロロホルム、アセトニトリル、トルエン、ジメチルスルホキシドまたはジメチルホルムアミドである請求の範囲第14項記載の方法。

17、また、少なくとも1種の存在する医薬学的に許容されるうる希釈剤または粗体を有する請求の範囲第1～11項のいずれかに記載のスターバーストコンジュゲート。

18、また、存在する他の活性成分を有する請求の範囲第17項記載のスターバーストコンジュゲート組成物。

19、診断剤として使用するための請求の範囲第1～11、17および18項のいずれかに記載のスターバーストコンジュゲート。

20、医薬学的粗体として使用するための請求の範囲第1～11、17および18項のいずれかに記載のスターバーストコンジュゲート。

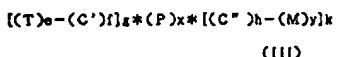
21、少なくとも1種の担持された医薬学的物質を含有する請求の範囲第1～11、17および18項のいずれかに記載の少なくとも1種のスターバーストコンジュゲートを、標的位置にまたはその付近に投与することを含んでなる前記少なくとも1種の担持された医薬学的物質を放

出する方法。

22、請求の範囲第4～7項のいずれかに記載の標的ディレクターおよび除去部分を含有する2官能性スターバーストコンジュゲートを投与することを含んでなり、前記標的ディレクターは前記コンジュゲートを標的位置に局在化し、そして前記除去部分は二次的に投与される治療用化合物または診断用化合物と結合することができる、治療用化合物または診断用化合物を除去する方法。

23、前記除去部分は、キレート剤、抗体または抗体である請求の範囲第22項記載の方法。

24、式



式中、

各C'は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

各C''は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

a および b の各々は個々に1またはそれより大きい整数を表わし、

c および d の各々は個々に0またはそれより大きい整数を表わし、

e は結合基が存在する場合共有結合を示し、

各Pはデンドリマーを表わし、

x は1またはそれより大きい整数を表わし、

Tは標的ディレクターを表わし、

各Mは担持された医薬学的物質の単位(例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の基本単位)を表わし、前記担持された医薬学的物質は同一の担持された医薬学的物質または異なる担持された物質であ

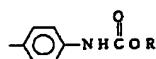
ることができ、詳しくは前記担持された医薬学的物質は生物活性因子であり。

γ は1またはそれより大きい整数を表わし、そして

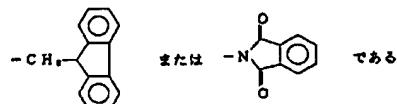
*は前記担持された医薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す。

のスターバーストコンジュゲートを調製する方法であって、反応性部分を有するPを、保護されたNH₂基をもつことができる、結合基、例えば、アニリン部分と反応させることを含んでなる前記方法。

24、前記保護基は、式



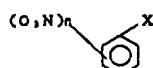
式中Rは-C(CH₃)₂、-CH₂-



または  である

を有する請求の範囲第23項記載の方法。

25、Rは、また、式



式中、nは1または2であり、そしてXはF、Cl、Br、I、SO₂、

明細書

スター-バーストコンジュゲート

本発明は、密なスター-ポリマー (dense star polymer) を駆動的物質のための担体として使用することに関する。最近、密なスター-ポリマーまたはスター-バーストポリマー (starburst polymer) と呼ぶポリマーが開発された。これらの密なスター-ポリマーまたはスター-バーストポリマーの大きさ、形状および性質は、特殊化された最終用途の合致するように分子的に調整可能であることが発見された。ポリマーの単位につき高い濃度の担持された物質の放出 (delivery) 、コントロールされた放出、ターゲット (targeted) 放出および/または多数の種の放出または使用のための手段を提供できるスター-バーストポリマーは、有意な利点を有する。

その最も広い面において、所望の物質とアソシエーション (association) した密なスター-ポリマーまたはスター-バーストポリマーを含んでなるポリマーのコンジュゲート (conjugate) 物質（以後、これらのポリマーのコンジュゲートを、しばしば、「スター-バーストコンジュゲート」または「コンジュゲート」と呼ぶ）、これらのコンジュゲートを調製する方法、コンジュゲートを含有する組成物およびコンジュゲートおよび前記組成物を使用する方法に関する。

本発明のコンジュゲートは、特別の放出を望む種々の用途における使用に適そして、とくに、生物学的に活性な因子の放出に適する。本発明の特許権の実施態様において、スター-バーストコンジュゲートは1種または2種以上の生物活性因子とアソシエーションした1種または2種以上のスター-バーストポリマーから構成されている。

第2A図は、非対称の（等しくない）枝の接合を有するデンドリマーを示す。

第2B図は、対称の（等しい）枝の接合を有するデンドリマーを示す。第3図は、抗体の寸法に関するデンドリマーの大きさを示す。

第4図は、種々のジェネレーションの中に組込まれたアスピリンについての炭素-13のスピニ格子緩和時間 (T₁) を示す。（実施例1）

第5図は、実施例2の力学的分析の結果を示す。

第6図は、実施例2からのpH 9.5におけるブソイドエフェドリンの透達速度へのジェネレーション6.5のデンドリマーの影響を示す。

第7図は、実施例3のブソイドエフェドリンの透達性へのデンドリマーの加水分解の影響を示す。

実施例8は、pH 5.0および6.65におけるスター-バーストポリマー (G = 4.0) の存在下にレセプター区画の中へ解放されたサリチル酸のパーセントとサリチル酸の対照との比較、実施例4、を示す。

第8図は、pH 8.0におけるレセプター区画におけるスター-バーストポリマー (G = 4.0) を有する共存体区画から失われたサリチル酸のパーセントとサリチル酸の対照との比較、実施例4、を示す。

第10図は、スター-バーストポリマー (G = 4.5) の存在下に共存体区画から失われたサリチル酸のパーセントとサリチル酸の対照との比較、実施例4、を示す。

スター-バーストポリマーは第1図によって図解され、ここでZは開始コアを表す（この図面において、3官能性開始コアは一番左の図に示されている）；Zは末端基を表わし、最初の場合において左から2番目の図面に示されており、スターブランチド (starbranched) オリゴマー

特表昭63-501876(3)

スター-バーストコンジュゲートは、スター-バーストポリマーの有利な性質のために、この技術的に知られた他の担体を超えた有意味の利益を提供する。スター-バーストポリマーは、半径方向の対称性をもつ規則正しい樹枝状の枝によって特徴づけられる、分子の構成を示す。これらの半径方向に対称な分子は、「スター-バーストの形態 (starburst topology)」を有すると呼ばれる。これらのポリマーは、開始コア (initiation core) のまわりに同心の樹枝状の列 (concentric dendritic tiers) を提供できる方法でつくられる。スター-バーストの形態は、開始コアのまわりの同心の樹枝状の列で有機反復単位が並んで構成されることによって形成される；これは、ある数の分子のジェネレーション (generation) を通る幾何学的に進展する方法で、多量度 (multiplicity) や自己複製 (self-replication) を導入することによって（各列内で）形成される。得られる高密度に官能化された分子は、それらの枝分れした（木に似た）構造ならびにそれらのオリゴマーの性質と異なり「デンドリマー (dendrimer)」と名付けられた。こうして、用語スター-バーストオリゴマーおよびスター-バーストデンドリマーは、用語スター-バーストポリマー内に包含される。形態的ポリマー、大きさおよび形狀がコントロールされた領域をもつ、は、それらの反応性末端基を通して共有的に架橋されているデンドリマーであり、これらはスター-バースト「架橋されたデンドリマー」と呼ばれる。用語架橋されたデンドリマーは、また、用語「スター-バーストポリマー」の範囲内に包含される。

図面の次の説明は、本発明の理解に役立つであろう。

第1図は、スター-バーストデンドリマーの種々のジェネレーションを示す。

と呼ぶ；A、B、C、DおよびEはスター-バーストデンドリマーの特定の分子のジェネレーションを表す；そして (A)_n、(B)_n、(C)_n、(D)_nおよび(E)_nはスター-バースト架橋デンドリマーを表す。

スター-バーストデンドリマーは、3つの区別される構成の特徴、すなわち、(a) 開始コア、(b) 開始コアに半径方向に取り付けられた反復単位から構成された内部の層（ジェネレーション、G）、および(c) 最も外側のジェネレーションに取り付けられた末端の官能基（すなわち、末端の官能基）の外側表面、を有する单一の分子の集合体 (assembly) である。スター-バーストデンドリマーの分子の大きさおよび形状およびデンドリマー分子中に存在する官能基は、開始コアの選択、デンドリマーをつくるとき使用するジェネレーション【すなわち、列 (tier)】の数、および各ジェネレーションで使用する反復単位の選択によってコントロールすることができる。デンドリマーは任意の特定のジェネレーションにおいて容易に単離することができるので、所望の性質を有するデンドリマーを得る手段が提供される。

スター-バーストデンドリマーの成分の選択は、デンドリマーの性質に影響を及ぼす。開始コアのタイプは、デンドリマーの形状に影響を及ぼすことがある、例えば、四面體円錐のデンドリマー、円筒形または球状のデンドリマー、横円状のデンドリマー、またはマッシュルーム状のデンドリマーを生成する（開始コアの選択に依存して）。ジェネレーションの順次組立て（すなわち、ジェネレーションの数および反復単位の大きさおよび性質）は、デンドリマーの寸法およびそれらの内部の性質を決定する。

スター-バーストデンドリマーは、枝の周辺に分布した官能基を有する

特表昭63-501876(4)

樹枝状の枝を含むする枝分れしたポリマーであるため、種々の性質をもつて調節できる。例えば、第2A図に示される高分子、およびスターバーストデンドリマー、例えば、第2B図に示すものは、枝の長さのため明確な性質を有することができる。第2A図に示すデンドリマーのタイプは非対称（等しくはないセグメント）の枝の複合、外部（すなわち、表面）の基（Z'で表される）、内部の部分（Zで表される）を有するが、内部の空所の空間が非常に少ない。第2B図に示す軽いデンドリマーのタイプは、表面の基（Z'で表される）をもつ対称（等しいセグメント）の枝の複合、ジェネレーション（G）の階数として変化する内部の空所の空間をもつ2つの異なる内部の部分（それぞれXおよびZで表される）を有する。デンドリマー、例えば、第2B図に示すものは、十分なジェネレーションを通して、空所の空間を完全に閉じつかつ含有して、主として中間の内部および高度の密集した表面をもつ実在因子（entity）を有する。また、スターバーストデンドリマーは、十分なジェネレーションを通して進展するとき、「スターバーストの密な充填」を示し、ここでデンドリマーの表面は十分な末端部分を有し、こうしてデンドリマーの表面は密集するようになり、そしてデンドリマーの内部内の空所の空間を取り戻す。この密集は分子のレベルのバリアーを提供することができ、そしてこのバリアーはデンドリマーの内部に入りあるいはそこから外に出る物質の拡散をコントロールするために使用できる。

デンドリマーの表面の化学は、前もって決定した方法で、所望の化学的官能性を有する反復単位を選択することによって、あるいは新しい表面の官能性をつくる表面の官能性のすべてあるいは一部を化学的に変更することによって、コントロールすることができる。これらの表面は、

特定の部位に向かってターゲティングすることができるか、あるいは特定の基または細胞による、例えば、細胞内皮系細胞による、吸収に対して抵抗性とすることができる。

スターバーストデンドリマーの別の使用において、デンドリマーは、それ自身、一緒に連結して、多樹枝状部分（スターバースト「架橋デンドリマー」）をつくることができ、そしてこれらの多樹枝状部分は、また、粗体として過する。

さらに、デンドリマーは特定のジェネレーションにおいて均一な枝分れからの変動を有するように調節することができ、こうして不連続性（すなわち、デンドリマー内の特定の位置における均一な枝分れからの変動）を付加する手段および異なる性質をデンドリマーに与えることができる。

本発明のスターバーストコンジュゲートにおいて使用するスターバーストポリマーは、技術的に知られている方法、例えば、米国特許第4,587,329号に従って調製することができる。

高度に均一な大きさおよび形状を有するデンドリマーを調製することができ、このようなデンドリマーは、最も重要な、デンドリマーの表面積の単位当たりより大きい官能基の数を可能とし、そしてスターバーストポリマーと同一の分子量、同一のコアおよびモノマー成分、および同一のコアの枝分れの数を有する多くのポリマーに比較して、分子の体積の単位当たり、より大きい数の官能基を有することができる。密なスターバーストポリマーの官能基密度の増大は、デンドリマー当たり、より大きい量の物質の担持を可能とする。デンドリマー使用の官能基の数は表面上においておよび内部においてコントロールできるので、それは、また、

デンドリマー当たりに放出すべき生物活性因子の量をコントロールするための手段を提供する。本発明のとくに軽い実施態様において、スターバーストポリマー、とくにスターバーストデンドリマーは、生物活性因子を特定の標的有機体に、あるいは標的有機体中の特定の決定基または位置に放出することのできる生物活性因子のターゲッテッド担体（targeted carrier）である。

早期のジェネレーションのスターバーストデンドリマー（すなわち、ジェネレーション-1～7）および古典的球状ミセルとの間の類比を行うことができる。デンドリマーミセルの類比は、それらが球を通して有する特徴、例えば、形態、大きさおよび表面を比較することによって説明した。

表 I

パラメーター	規則的な古典的ミセル	スターバーストデンドリマー
球状	球状	球状
大きさ（直径）	20～80 Å ¹	17～87 Å ¹
表面	4～202	Z=6～192（Zは表面の基の数である）（ジェネレーション=2～7）
表面の基の数		
面積/表面の基	130～80 Å ²	127～75 Å ²
（Å ² =10 ⁻¹⁸ m ² ; 1 Å ² =10 ⁻¹⁸ m ² ）		

表 Iにおいて、形態は走査型電子顕微鏡写真（SEM）および固有粘度（η）の測定によって評価した。大きさは固有粘度（η）およ

び大きさ排除クロマトグラフィー（SEC）の測定によって評価した。表面の密集の数は、タイターメトリー（titrometry）および高い場のNMRによって評価した。面積（area）/表面の基はSECの流体力学的測定から計算した。

スターバーストポリアミドアミン（PAMAM）デンドリマーの最初の5つのジェネレーションは、ほとんどすべての面（すなわち、形状、大きさ、表面の基、および/または面積/表面の基）において古典的球状ミセルを非常に密接に模倣した微小領域（microdomain）である。しかしながら、主要な差は、それらがミセルの力学的に平衡化する性質に比べて共有的に固定しつつ強固であるということである。この差は、これらの微小領域をカプセル化装置として使用するとき、1つの有意な利点である。

5を超えてジェネレーションを同心的にさらに加えると、表面の密集化が起こる。この密集化は表面におけるバリアーの特性を増加することができ、そして、表 IIに示すように、それ自身ヘッド（表面）基当たりより小さい表面積を表わす。

特表昭63-501876(5)

例えば、アミン末端ジエチレイン・5、6、0、7、0、8、0および9、0は、それぞれ、104、82、73、47および32人¹の増加した表面積を有する。この特性は、より低く密接したミセル様表面から、通常小胞（リボソーム）またはラングミュール・プロジェクト（Langmuir-Blodgett）型膜とアソシエーションした、より高く密接した2層／1層バリアー様表面への遷移に相当する。

この表面の密度が発生している場合、物理的特性および形態の変化は、中間のジエチレイン（6～8）からより進行したジエチレイン（9または10）へのジエチレインの増加として観察されるであろう。ジエチレイン＝7、0、8、0および9、0についての検査透過型電子顕微鏡写真（STEM）は、メタノール溶液を試料の各々から除去して無色、半透明の固体のフィルムを得、そしてこれを四塩化オスマウムで着色することによって得た。予測した形態学的変化はジエチレイン＝9、0の段階で起こった。ジエチレイン＝9、0における最小領域は、直径が約33Å¹であると測定され、そして厚さが約25Å¹である無色のヘリによって囲まれている。明らかにメタノール溶液は25Å¹の外側の膜様バリアー内の捕捉されて、暗色に着色された内部を与えた。こうして、ジエチレイン＝9、0において、スターバーストPAMAMは形態的に小胞（リボソーム）のように挙動している。しかしながら、このスターバーストは、リボソームに比較して、大きさが1桁小さくかつ非常に単分散している。結果、本発明のデンドリマーは、直徑が約33Å¹（体積約1,8,000Å³）またはそれ以上の程度の大きさの、溶液充填された空所の空間を分子的にカプセル化するために使用できる。これらのミセル大きさの原型（prototype）は、こ

デンドリマーの表面ジエチレイン									
ジエチレイン	1	2	3	4	5	6	7	8	9
表面の面積、Z の値	6	12	24	48	96	192	384	768	-
分子量	275	875	2411	5147	10,619	21,563	43,541	87,227	174,779
直径 ¹	10.4Å	15.8Å	22Å	31Å	40Å	53Å	67Å	76Å	88Å
測定SEC 溶液濃度/デシ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
直径 ¹ 、 分子量/面積 ¹	365Å ¹	733Å ¹	1519Å ¹	3038Å ¹	6,020Å ¹	14,036Å ¹	18,139Å ¹	36,083Å ¹	-
表面積/面積 ¹	122Å ²	131Å ²	127Å ²	126Å ²	104Å ²	92Å ²	73Å ²	47Å ²	32Å ²
2層膜の直徑 空所体積	12.4Å	12.8Å	12.7Å	12.6Å	11.5Å	10.8Å	9.8Å	7.75Å	6.28Å
空所体積	311.6Å ³	1,470.2Å ³	4,737.9Å ³	11,427.0Å ³	-	-	-	-	-

* 単分散に対して直径を定めた大きさ押出クラムドチャーフィーの測定によつて決定した液体力学的直徑

$$\left(\frac{R_s}{R_a} = 1.02 \right) \text{ がリエレンチャシドの直徑。}$$

$$1\text{A} = 10^{-10}\text{m} ; 1\text{A}^2 = 10^{-20}\text{m}^2 ; 1\text{A}^3 = 10^{-30}\text{m}^3.$$

の進展したジエチレインの段階で、共有的に固定されたリボソームのように挙動するよう見えある。この挙動は、これらの原型が、素物放出因子として、あるいは種々の哺乳動物の病気の処置のためのスターバースト抗体コンジュゲートにおいて、酢酸リード化放射性抗原のための载体として、働くことを可能とする。

本発明のコンジュゲートにおいて使用するために適当なデンドリマーは、米国特許第4,507,468号、米国特許第4,558,120号、米国特許第4,568,737号および米国特許第4,587,329号に記載されている密なスターポリマーまたはスター-バーストポリマーである。

とくに、本発明は、少なくとも1単位の少なくとも1種の担持された製薬学的物質とアソシエーションして少なくとも1種のスター-バーストポリマーを含んでなるスター-バーストコンジュゲートに関する。本発明の範囲内に包含されるスター-バーストコンジュゲートは、式：

式：

$$(P)^x * (M)^y \quad (1)$$

式中、各Pはデンドリマーを表わし、

xは1またはそれより大きい整数を表わし、

各Mは担持された製薬学的物質の単位（例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の基本単位）を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる担持された製薬学的物質であることができ、

yは1またはそれより大きい整数を表わし、そして

*は前記担持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーシ

ョンしていることを示す、

によって表わされるものを包含する。

式(1)の好ましいスター-バーストコンジュゲートは、Mが、薬物、放射性標識、キレート剤、キレート化金属、トキシン（toxin）、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子（signal generator）、シグナル反射因子（signal reflector）、またはシグナル吸収因子（signal absorber）であるもの、とくに好ましくはx=1であり、かつy=2またはそれより大であるものである。

また、スター-バーストデンドリマーが、多枝状構成体（すなわち、 $x > 1$ ）を形成するように、必要に応じて連結基を介して、一緒に共有的に連結したスター-バースト架橋デンドリマーである式(1)のスター-バーストコンジュゲートが含まれる。スター-バースト架橋デンドリマーの使用は、局所的にコントロールされた解放因子（release agent）、放射線活度切削剤などを包含する。

ここで使用するとき、「アソシエーションする（associated with）」は、1種または2種以上の担持された物質がデンドリマーのコア内にカプセル化または捕捉され、デンドリマーを通じて部分的にまたは完全に分散し、あるいはデンドリマーに取り付けられまたは連結されることができる、あるいはそれらの組み合せを意味する。1種または2種以上の担持された物質（carried material）および1種または2種以上のデンドリマーのアソシエーション（association）は、必要に応じて、コネクター（connector）および/またはスペーサー（spacer）を使用して、スター-バーストコンジュゲートの調製または使用を促進することができる。適当なコネクターの基（connecting group）は、ター

ゲティングディレクター (targeting director) (すなわち、T) の有効性またはスター-バーストコンジュゲート中に存在する1種または2種以上の他の担持された物質 (すなわち、M) の有効性を有意に損傷しないで、ターゲティングディレクターをデンドリマー (すなわち、P) に連結 (link) する基である。これらのコネクターの基は、切離しが可能なあるかあるいは不可能であることができ、そして典型的にはターゲティングディレクターとデンドリマーとの間の立体的障害を回避するように使用され、肝ましくはコネクターの基は安定 (すなわち、切離し不可能) である。スター-バーストデンドリマーの大きさ、形状および官能基の密度は厳密にコントロールできるので、担持された物質をデンドリマーのアソシエーションさせることのできる多くの方法が存在する。例えば、(a) 1種または2種以上の担持された物質とデンドリマーの表面にあるいはその付近に位置する、実在因子、典型的には官能基との間の、共有的、クーロン的、疎水性的またはキレート的なタイプのアソシエーションが存在することができる；(b) 1種または2種以上とデンドリマー内部内に位置する部分との間の、共有的、クーロン的、疎水性的またはキレート的なタイプのアソシエーションが存在することができる；(c) デンドリマーは、担持された物質を内部 (空所の体積) 内に物理的に拘束することを可能とするように、主として中空である内部を有するように調整することができ、ここで担持された物質の解放は、必要に応じて、デンドリマーの表面を拡散コントロール性部分と密集 (congesting) させることによって、必要に応じてコントロールすることができる；あるいは、(d) 前述の減少の種々の組み合わせを使用することができる。

デンドリマー、ここで「P」で表わす、は、米国特許第4, 507, 486号、米国特許第4, 558, 120号、米国特許第4, 568, 737号または米国特許第4, 587, 329号に記載されている密なスター-ポリマーを包含する。

担持された製薬学的物質、ここで「M」で表わす、は、次の物質を包含する：デンドリマーの物理的一体性を感知しうる程度に乱さないで、街なスター-ポリマーとアソシエーションさせることのできる、診断または治療の処置のために生体内または生体外で使用する任意の物質、例えば、薬物、例えば、抗体、鎮痛剤、高血圧剤、強心剤など、アセトアミノフェン、アシクロビア (acyclovir)、アルケラン、アミカシン、アムピシリン、アスピリン、ビスマントレン、ブレオマイシン、ネオカージオスタチン、クロラムブシル、クロルアンフェニコール、サイトアラビン、ダウノマイシン、ドキソルビシン、フルオロウラシル、ゲンタマイシン、イブプロフェン、カナマイシン、メプロバメート、メトトレキセート、ノバントロン、ニスクチン、オンコピン、フェノバルビタール、ボリミキシン、プロプロコール、プロカルバビジン、リファンビシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、シムメトリル、チオグアニン、トブラマイシン、トリメトプリム、バルバム；トキシン、例えば、ジフテリアトキシン、グロブリン、エクソトキシン A、アブリン、モデシン、リシン、またはそれらのトキシン断片；金属イオン、例えば、アルカリ金属およびアルカリ土類金属；放射性核種、例えば、アクチニドまたはランタニドまたは他の同様な遷移元素から、あるいは次のような他の元素から発生するもの、 ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{105}Rh , ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{153}Sm , ^{159}Gd ,

^{175}Yb , ^{177}Lu , ^{88}Y , ^{168}Ho , ^{115}In , ^{109}Pd , ^{82}Rb , ^{194}Ir , ^{140}Ba , ^{148}Pm , ^{199}Au , ^{140}La 、および ^{188}Re ；シグナル発生因子、例えば、蛍光性実在因子；シグナル反応因子、例えば、常磁性実在因子、例えば、 ^{55}Fe , ^{64}Gd , ^{55}Mn ；キレート化金属、例えば、キレート剤とアソシエーションしたとき、それらが放射性であるか否かにかかわらず、上に記載した任意のもの；シグナル吸収因子、例えば、電子ビーム不透明白剤；抗体、例えば、モノクローナル抗体および抗イディオタイプ抗体；抗体断片；ホルモン；生物学的に応答性の修飾因子、例えば、インターロイキン、インターフェロン、ウイルスおよびウイルス断片；診断用不透明白剤；および蛍光性部分。担持された製薬学的物質は、除去因子 (scavenging agent)、例えば、キレート剤、抗原、抗体、あるいは治療用または診断用の因子を選択的に除去できる他の部分を包含する。

肝ましくは、担持された製薬学的物質は生物活性因子である、ここで使用するとき、「生物活性 (bioactive)」は、活性実在因子、例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の実在因子を呼び、それらは、ターゲッタード (targeted) 実在因子、例えば、蛋白質、糖蛋白質、リボ核酸、脂質、ターゲッタード細胞、ターゲッタード器官、ターゲッタード有機体 [例えば、微生物または動物 (哺乳動物、例えば、ヒトを含む)] または他のターゲッタード部分を検出、同定、阻害、処理、触媒、コントロール、殺す、増強または修飾 (modify) することができる。

式 (1) のスター-バーストコンジュゲートは、PをMと、通常適当な溶媒中で、担持された物質 (M) とスター-バーストデンドリマー (P) とのアソシエーションを促進する温度において、反応させることによっ

て調製される。

適当な溶媒は、PおよびMが少なくとも部分的に混和性でありかつコンジュゲートの生成に対して不活性である溶媒である。PおよびMが互に少なくとも部分的に混和性である場合、溶媒は不需要である。必要なとき、適当な溶媒の混合物を利用できる。このような適当な溶媒の例は、水、メタノール、エタノール、クロロホルム、アセトニトリル、トルエン、ジメチルスルホキシドまたはジメチルホルムアミドである。

式 (1) のスター-バーストコンジュゲートの生成のための反応条件は、特定のデンドリマー (P)、所望の製薬学的物質 (M)、および生成する結合 (*) の性質に依存する。例えば、Pがメチレンカルボキシレートの表面をもつPEI (ポリエチレンイン) スター-バーストデンドリマーであり、Mが放射性核種、例えば、イットリウムである場合、反応は室温において水中で実施される。しかしながら、Pがエヌテル末端PAMAMスター-バーストデンドリマーであり、Mがアスピリンである場合、反応は室温においてクロロホルム中で実施する。典型的には、反応は室温ないし遅涼温度の範囲内ができる。特定の溶媒および温度の選択は当業者にとって明らかであろう。

M : Pの比は、デンドリマーの大きさおよび担持された物質の量に依存する。例えば、イオンのM対Pのモル比 (モルの比) は通常0.1~1.000:1、肝ましくは1~50:1、より肝ましくは2~6:1である。薬物またはトキシンのM対Pの重量比は通常0.1~5:1、肝ましくは0.5~3:1である。

Mが放射性核種であるとき、スター-バーストコンジュゲートを調製する3つの方法が存在する。すなわち、(1) Pをキレート剤として使用

できる。例えば、メチレンカルボキシレートの表面のPEIまたはPAMAMは金属、例えば、イットリウムまたはインジウムをキレート化するであろう。(2)キレートをPに共有的に結合することができる。例えば、アミン末端PEIスター-バーストデンドリマーを1-(p-イソチオシアナトベンジル)ジエチレントリアミンベンジル断端と反応させ、次いでキレート化することができるか、あるいは複合体、例えば、イソチオシアナトベンジル-2,3,2-tetとキレート化した塩化ロジウムを反応させることができる。(3)前もってキレート化した放射性核種をPと親水性またはイオンの相互作用によってアソシエーションさせることができる。

とくに好ましいスター-バーストコンジュゲートは、標的ディレクター(ここで「T」と表示する)を含むしかつ式：

$$(T) \circ * (P) x * (M) y \quad (II)$$

式中、

各Tは標的ディレクターを表わし、

\circ は1またはそれより大きい整数を表わし、そして
P, x, *, Mおよびyは前に定義した通りである。
によって表わされるコンジュゲートである。式(II)のスター-バーストコンジュゲートのうちで、Mが、薬物、放射性核種、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反射因子、またはシグナル吸収因子であるものは好ましい。また、好ましいコンジュゲートは $\circ = 1$ または2であるコンジュゲート、および $x = 1$ でありかつ $y = 2$ またはそれより大であるものである。とくに好ましいコンジュゲートは、 $x = 1$, $\circ = 2$, $y = 2$ またはそれより大

であり、およびMおよびTがポリマーと同一もしくは相異なるコネクターを介してアソシエーションしているものである。

式(II)のスター-バーストコンジュゲートは、T * Pを形成し、次いでMを加えることによって、あるいはP * Mを形成し、次いでTを加えることによって調製する。いずれの反応装置も、特定のコンジュゲートの成分に悪影響を及ぼさない反応において、かつ必要なとき適当な溶媒の存在下に、実施する。pHをコントロールするために、緩衝剤または適当な酸または塩基の添加を用いる。反応条件は、形成するアソシエーション(*)のタイプ、使用するスター-バーストデンドリマー(P)、保持された製薬学的物質(M)、および標的ディレクター(T)に依存する。例えば、Tがモノクローナル抗体でありかつMが放射性核種であるとき、T * Pのアソシエーションは、官能基、例えば、イソチオシアノートを介して、水中で、あるいは有機溶剤、例えば、アセトニトリルまたはジメチルホルムアミドおよび水の中で、実施する。通常、コンジュゲーション(conjugation)は緩衝液中でpH 7~10、好ましくはpH 8.5~9.5において実施する。次いで、形成したコンジュゲートを放射性核種、例えば、酢酸イットリウムと、好ましくは室温においてキレート化する。あるいは、PおよびMは、通常水中で、Tへのコンジュゲーション前に、キレート化することができる。Tとのコンジュゲーションは適当な緩衝液中で実施する。

T : Pの比は、ことにTが抗体または断片であるとき、好ましくは1:1である。M : Pの比は前の通りであろう。

スター-バーストコンジュゲートをターゲティング(targeting)できる標的ディレクターは、本発明のスター-バーストコンジュゲートにおいて

て使用したとき、スター-バーストコンジュゲートの少なくとも一部を所望の標的(例えば、蛋白質、糖蛋白質、リボ蛋白質、脂質、ターゲットド細胞、ターゲットド器官、ターゲットド有機体または他のターゲットド部分)に放出する实在因子であり、そして抗体、好ましくはモノクローナル抗体、抗体断片、例えば、Fab、F(ab')断片または要求する標的特異性を有する他の抗体断片、ホルモン、生物学的に応答性の修飾因子；標的特異性を示す化学的官能性などを包含する。

ここに記載する好ましいスター-バーストコンジュゲートにおいて使用できる抗体または抗体断片は、この分野においてよく知られた技術によって調製できる。高度の特異的なモノクローナル抗体は、この分野においてよく知られたハイブリダイゼーション技術、例えば、コクラー(Kohler)およびミルスティン(Milstein)(1975、ネイチャー(Nature)256:495~497;および1976、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Bur. J. Immunol.)6:511~518)、によって生成することができる。このような抗体は通常高度に特異的な反応性を有する。

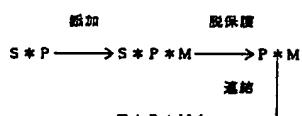
抗体ターゲットドスター-バーストコンジュゲートにおいて、抗原またはハプテンに対して向けられた抗体を使用できる。普通のポリクローナル抗体を使用できるが、モノクローナル抗体はいくつかの利点を提供する。各モノクローナル抗体は単一のエピトープに対して高度に特異的である。さらに、大量の各モノクローナル抗体を生成することができる。本発明において使用する抗体は、例えば、腫瘍、バクテリア、真菌(Fungi)、ウイルス、寄生虫、マイコプラズマ、分化および他の細胞膜抗原、病原性表面抗原、トキシン、酵素、アレルゲン、薬物および生物学

的に活性な分子に対して向けることができる。抗原のより完全なリストについては、米国特許第4,193,983号を参照。

さらに抗体または断片をデンドリマーに結合すること、および特定の場合において、異なる特異性の抗体を結合することが望ましいことがある。例えば、超薄を局在化しあつその結合し、次いで調節する細胞毒性化合物、診断の化合物または生体幹力学的化合物を除去する能力を有する2官能性コンジュゲートを設計することができる。

標的ディレクターの不存在下に(または必要に応じて標的ディレクターの存在下に)、デンドリマーの表面にあるいはその付近に位置できる官能基の数のために、このような官能基のすべてまたは実質的な部分を、アニオン性、カチオン性または親水性として、反対電荷の所望の標的へ、あるいは親水性もしくは親水性の適合性標的へ、スター-バーストコンジュゲートを放出することを効果的に促進することができる。

保護されたハンドル(handle)(S)をもつPを使用する式(II)のコンジュゲートの調製は、また、式(II)のコンジュゲートを調製するための1つの方法として意図する。この反応の概要を下に示す：



ここで、

S - Pは保護されたデンドリマーを表わし、

S - P - MはMとコンジュゲーションした保護されたデンドリマーを表わし、

特表昭63-501876(8)

$P \circ M$ は M (スター-バーストコンジュゲート) とコンジュゲートしたデンドリマーを表わし、そして

$T \circ P \circ M$ は標的ディレクターに連結したスター-バーストコンジュゲートを表わす。

$P \circ M$ に影響を及ぼさない適当な接頭を使用できる。例えば、 S が $-l$ -ブロキカルバメートであるとき、 S は水性によって除去することができる。

また、ポリマーが直接に、あるいはコネクターを介してアソシエーションしているスター-バーストコンジュゲートを開裂する；これらのスター-バーストコンジュゲートは、式：

$$[(T)a-(C')f]g*(P)x*[(C'')h-(M)y]k \quad (II)$$

式中、

各 C' は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

各 C'' は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

a および f の各々は個々に 1 またはそれより大きい整数を表わし、

x および h の各々は個々に 0 またはそれより大きい整数を表わし、

$-l$ は結合基が存在する場合共有結合を示し、そして

P 、 x 、 $*$ 、 M 、 y 、 T および e は前記に定義した通りである。

式 (III) のスター-バーストコンジュゲートのうちで、 M が、放射性核種、薬物、トキシン、シグナル発生因子、シグナル反射因子またはシグナル吸収因子であるものは好ましい。また、 $x=1$ であるものは好ましいコンジュゲートである。とくに好ましいコンジュゲートは、 x 、 e 、 f 、 h および y の各々が 1 であり、 g が 1 またはそれより大であり、そして k が各々独立に 2 またはそれより大きいものである。 x 、 e 、 f 、 h 、 y およ

び g の各々が 1 であり、そして k が 2 またはそれより大きいコンジュゲートは最も好ましい。また、 M が生物学的因子、例えば、放射性核種、薬物またはトキシンを表わすスター-バーストコンジュゲートはとくに好ましい。

C'' によって表わされる適当な結合基は、担持された薬理学的物質の有効性またはスター-バーストコンジュゲート中に存在する標的ディレクターの有効性を有意に損傷しないで、担持された薬理学的物質をデンドリマーに連結する基である。これらのコネクターは、担持された薬理学的物質の活性のモードに依存して、安定（すなわち、切離し不可能）または切離し可能でなくてはならず、そして、典型的には、担持された薬理学的物質とポリマーとの間の立体障害を回避するために使用される。

デンドリマーが直接にあるいはコネクターを介して、抗体または抗体断片にアソシエーションしているコンジュゲートは最も好ましい。これらの好ましいコンジュゲート中のポリマーは、さらに、必要に応じて直接にあるいはコネクターを介して、1 種または 2 種以上の担持された物質、好ましくは放射性核種にアソシエーションできる。このようなスター-バーストコンジュゲートは、式：

$$[(抗体)a-(C')f]g*(P)x*[(C'')h-(M)y]k \quad (IV)$$

式中、

各抗体は希望のエピトープと相互作用できる抗体または抗体断片を表わし、

ーは結合基が存在する場合共有結合またはクーロン的結合を示し、そして

P 、 x 、 $*$ 、 M 、 T 、 e 、 y 、 C' 、 C'' 、 g 、 k 、 f および h は前記に定

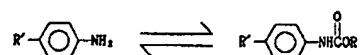
義した通りである。

標的ディレクター (targeting director) (T) との連結に有効な官能基 (C' または C'') を有するスター-バーストデンドリマー (P) の上の合成のために、好ましい方法は反応性官能基が合成前駆体として保護されることを必要とする。この保護は非常に高い品質のデンドリマーまたはコンジュゲートの合成を可能とするので、好ましい。この方法は、そうでなければ、また、連結官能基との反応を生じ、こうして標的ディレクター (T) への取り付けを不可能とするであろう方法において、1 単位の担持された薬理学的物質 (M) をスター-バーストデンドリマー (P) の末端官能基への化学的結合を可能とする。引続く脱保護または所望の連結官能基への合成の転化は、こうして、スター-バーストコンジュゲートの標的ディレクターへの連結を可能とする。

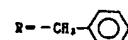
好ましい「連結 (linking)」のための官能基 (以後「ハンドル」と呼ぶ) の 1 つは、アニリン部分である。この基は標的ディレクターへの連結に直接使用できるか、あるいは標的ディレクターとの反応に適当な他の官能基、例えば、イソチオシアネート、イソシアネート、セミチオカルバジド、セミカルバジド、プロモアセトアミド、ヨードアセトアミドおよびマレイimid に容易に変更できるので、好ましい。アニリン部分はスター-バーストデンドリマーの合皮において使用するために容易に保護することができるので、また、標的ディレクターとの連結のためのハンドルとして好ましく、あるいはニトロ基を前駆体として使用でき、次いでこれを合皮の終りにおいて所望のアミノ官能に転化することができる。

スター-バーストデンドリマーの合皮の間にアミニノアミノ官能性を保

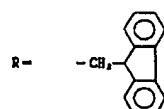
護するために適当な、ある数の保護基が存在する。〔参照、テオドロ (Theodor) W. グリーン (Green)、有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis.)、発行、ジョン・ Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク、1981〕。保護基の好ましいクラスは、下に示すカーバメートである。



多くのカーバメートがアミンの保護に使用されてきている。スター-バーストデンドリマーの合成に最も好ましいカーバメートは l -ブロキカルバメート、 $\text{R}=-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ である。脱保護は酸和水解によって達成される。ベンジルカルバメート保護基、



は、また、好ましく、これはデンドリマーが酸和水解に感受性であるとき好ましい。脱保護は酸和水素化によって達成される。また、9-フロルオレニルメチルカルバメート、



は好ましい。

フルオロイミド保護基、例えば、

特表昭63-501876(9)



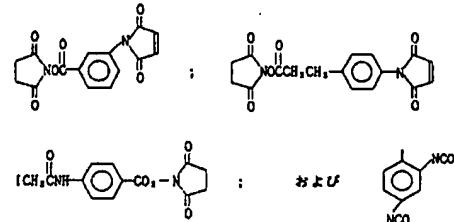
は、また、好ましい。

文献においてよく知られているアミンのために使用される他の保護基は、また、この合成の計画において使用できる。使用の好ましさは、例示として与えただけであり、使用できる保護基のみではない。反応条件下に安定でありかつスター-バーストデンドリマーの一體性を変更しないで除去できる保護基を使用できる。

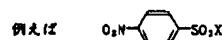
上の方法は、アミノフェニル官能性をアミノ基含有因子の中に導入することができ、次いでこれをある生物活性因子、例えば、モノクローナル抗体または酵素とコンジュゲーションすることができる。この因子は陰化のカップリング (coupling) によって生物活性因子、例えば、抗体の上の炭水化物へコンジュゲーションすることができる。アミノフェニル基は、また、生物活性因子上のリジン残基のペンドント (pendant) アミノ基との引続く反応のために、イソチオシアネートまたはイソシアネートに転化することができる。

別の方針は、活性化ハロゲン化アリール、例えば、4-ニトロフルオロベンゼン、と、コンジュゲーションのための因子、例えば、スター-バーストポリエチレンimin (PEI) の上のアミノ官能との反応、および引続くコンジュゲーションのためのニトロ基のアリニン官能性への引続く接触水素化を包含する。それは因子、例えば、ポリアミンのためにとくに有用であり、これは、すべての非選元性反応の条件に対して

ニトロフェニル官能性の相対的化学的不活性のために、使用前にそれ以上の修飾に必要である。より普通の2官能性連結因子、例えば、活性なエスチルまたはジイソシアネート (これらは多数の反応条件下に反応性でありかつそれらをコンジュゲーションのために使用不可能とするであろう) は、次のものを包含する:



本発明は、また、ニトロ置換アリールスルホニルハライドを使用して、例えば、スルホニアミド、

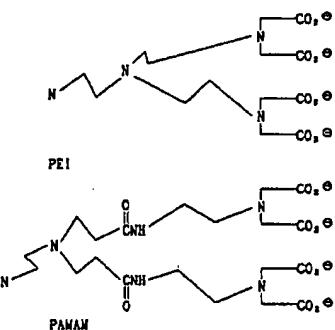


を生成することを包含する。

コンジュゲーションのためにアミノフェニル基を導入する既知の方法を越えたこの方法の利点は、それが合成の後期の段階で起こるということである。ガンショウ (Gauze) ら、米国特許第4,472,509号は、彼の方法において、ニトロフェニル基を長い合成の手順の最初の段階で導入し、これによって利用可能な化学について制限を有する。

この方法は、また、分子の狭部と明確に区別可能であるハンドルを導入する。マナベ (Manabe) らは、残留アミンによるコハク酸無水物の開環がカップリング基を与え、これを通じて抗体へのコンジュゲーションが可能であることを示した。しかしながら、この方法は、キレート剤が連結基と同一であるので、ポリマー上のキレート化しない部位の間を区別する手段を与えていた。

本発明の方法は、また、肝ましくはPEIアセテートデンドリマーにより、スター-バーストデンドリマーを使用するランダニドの直接の合成を提供する。対照的に、デンケウォルター (Dankewalter)、米国特許第4,289,872号は、表面上のアセテートの適切な配置がはたらくことを述べている。しかしながら、本発明の反応は、PEIアセテートがPAMAMより非常によくはたらく、すなわち、イミノアセテートの表面はこの物質の一部のみであり、主鎖および枝分れの性質は同様によく非常に重要であることを示す。PEIアセテートはPAMAMアセテートよりもすぐれたキレート化性質を有する。



式(I V)のスター-バーストコンジュゲートのうちで、Mが、放射性核種、薬物、トキシン、シグナル発生因子、シグナル反射因子またはシグナル受容因子であるものは好ましい。また、x=1であるコンジュゲートは好ましい。x、a、f、hおよびyの各々が1であり、gが1またはそれより大であり、そしてkの各々が2またはそれより大であるコンジュゲートはとくに好ましい。x、a、f、h、yおよびkの各々が1であり、そしてkが2またはそれより大であるコンジュゲートは最も好ましい。また、「抗体」がモノクローナル抗体またはそのエピトープ結合性断片を表わすスター-バーストコンジュゲートはとくに好ましい；Mが生物活性因子、例えば、放射性核種、薬物またはトキシンを表わすものはことに好ましい。

スター-バーストコンジュゲートは、種々の生体外または生体内の診断の応用、例えば、ラジオイムノアッセイ、核磁気共鳴分光分析、コント

特表63-501876(10)

ラスト撮影 (contrast imaging) およびイムノシントグラフィー (Immunoangiography) のため、分析的応用、治療の応用において、抗体、放射性核種、薬物または病気の状態、例えば、癌、自己免疫病、中枢神経系の疾患、伝染病および心臓疾患の処置における使用に適する他の因子の担体として使用することができ、あるいは他の有用な因子の製造のための出発物質として使用できる。

本発明は、また、スター-バーストコンジュゲートが他の適當なビクルと配合されたスター-バーストコンジュゲート組成物に関する。スター-バーストコンジュゲートの組成物は、必要に応じて、他の活性成分、添加剤および/または着色剤を含有する。

本発明のスター-バーストコンジュゲートにおいて使用するために肝ましいスター-バーストポリマーは、コアから発する、少なくとも1つの枝分れ（以後、コアの枝分れと呼ぶ）、肝ましくは2またはそれより多い枝分れを有するスター-バーストポリマーとして記載することができるポリマーであり、前記枝分れは少なくとも1つの末端基を有し、ただし（1）末端基コアの枝分れの比は1より大であり、肝ましくは2またはそれより大であり、（2）ポリマーにおける単位体積当たりの末端基の密度は、同様なコアおよびモノマー部分および匹敵する分子量および数のコアの枝分れを有する延長した従来のスター-ポリマーのそれの少なくとも1.5倍であり、延長した従来のスター-ポリマーのこのような枝分れの各々は1つだけの末端基を有し、そして（3）分子の体積は、目盛付きコウレイ-パウリング (Corey-Pauling) の分子モデルを使用する寸法の研究によって決定して、前記延長した従来のスター-ポリマーの分子体積の約80%より多くない。ここで使用するとき、用語「密な」は、

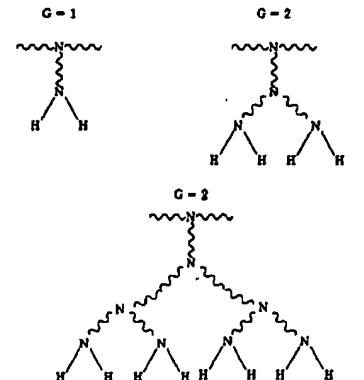
「スター-ポリマー」または「デンドリマー」を修飾するとき、それが同一の分子量を有する延長した従来のスター-ポリマーより小さい分子体積を有することを意味する。密なスター-ポリマーと比較するためのベースとして使用する延長した従来のスター-ポリマーは、密なスター-ポリマーと同一の分子量、同一のコアおよびモノマー成分および同一の数のコアの枝分れを有するものである。「延長した (extended)」とは、従来のスター-ポリマーの個々の枝分れがそれらの最大の長さに延長または伸張されていること、例えば、スター-ポリマーがそのための理想的な構造中に完全に溶解されているとき、このような枝分れが存在することを意味する。さらに、末端基の数は従来のスター-ポリマーの分子よりも密なスター-ポリマーの分子について大きいが、末端基の化学的構造は同一である。

本発明のコンジュゲート中に使用するデンドリマーは、この分野において知られている方法によって調製できる。上のデンドリマー、個々の共反応成分およびコア成分、およびそれらの調製方法は、米国特許第4,587,329号におけるように定義することができる。

本発明のコンジュゲート中に使用するためのデンドリマーは、付加反応および環換反応を行なうために十分に反応性である末端基を有することができる。このような末端基の例は、アミノ、ヒドロキシ、メルカプト、カルボキシ、アルケニル、アリル、ビニル、アミド、ハロ、尿素、オキシラニル、アジジニル、オキサゾリニル、イミダゾリニル、スルホナト、ホスホナト、イソシアナトおよびイソチオシアナトを包含する。末端基は修飾して、それを生物学的に不活性とすることができます、例えば、それを免疫原性とすることができますか、あるいは肝臓、脾臍または他の

器官における非特異的吸収を回避することができる。デンドリマーは従来のスターまたはスター-枝分れポリマートと異なり、デンドリマーは等しい数のコアの枝分れおよび等しいコアの枝分れの長さを有する従来の延長したスター-ポリマーよりも、分子体積の単位体積当たりの末端基の密度が大きい。こうして、デンドリマー中の単位体積当たりの末端基の密度は、通常、従来の延長したスター-ポリマーにおける末端基の密度の少なくとも1.5倍、肝ましくは少なくとも5倍、より肝ましくは少なくとも10倍、最も肝ましくは15~50倍である。密なポリマー中のコアの枝分れ当たりの末端基の比は、肝ましくは少なくとも2、より肝ましくは少なくとも3、最も肝ましくは4~1024である。肝ましくは、所定のポリマーの分子量について、密なスター-ポリマーの分子体積は、従来の延長したスター-ポリマーの分子体積の70容量%より小、より肝ましくは18~60容量%、最も肝ましくは7~50容量%である。

本発明のコンジュゲート中に使用する肝ましいデンドリマーは、樹枝状の枝に共有結合した1個または多個のコアを有するとして特徴づけられる。このような規則正しい枝分れは次の順序によって示され、ここでGはジェネレーションの数を表す：



数学的には、樹枝状の枝使用の末端基の数 (#) および枝分れのジェネレーションの数との間の関係は次のように表わすことができる：

$$\text{末端基の#/樹枝状の枝} =$$

$$\frac{Nr \cdot G}{2}$$

式中、Gはジェネレーションの数であり、Nrはアミンの場合において少なくとも2である反復単位の多重度 (multiplicity) である。デンドリマー中の末端基の合計の数は、次によって決定される：

$$\frac{Nr \cdot G}{2}$$

式中、GおよびNrは上に定義した通りであり、そしてNrはコア化合物の原子価（しばしばコアの官能性と呼ばれる）を表す。したがって、

特表昭63-501876(11)

本発明のデンドリマーはその成分部分において次のように表わすことができる：

$$(コア) \left\{ \begin{array}{l} (\text{反復単位}) \frac{N_r G_{r-1}}{N_r - 1} \text{ 来端部分 } N_r G_r \\ \end{array} \right\} N_0$$

式中、コア、来端部分、G および N_0 は上に定義した通りであり、そして反復単位は N_r + 1 の原子個または官能性を有し、ここで N_r は上に定義した通りである。

本発明の目的に対して好ましいデンドリマーであるコポリマーのデンドリマーは、高度に枝分れした（樹枝状の）列（array）で多官能性モノマー単位から構成された独特の化合物である。デンドリマーの分子は、多官能性開始単位（コアの化合物）、多官能性反復単位および来端単位から構成され、そして来端単位は反復単位と同一であるかあるいは異なることができる。コアの化合物は式① (Z') N_0 によって表わされ、ここで ① はコアを表わし、Z' は ① に結合した官能基であり、そして N_0 はコア官能性を表わし、この官能性は好ましくは 2 またはそれより大であり、最も好ましくは 3 またはそれより大である。こうして、デンドリマーワークはある数 (N_0) の官能基、Z'、に結合した多官能性コア、①、からなり、それらの各々は第 1 ジェネレーションの反復単位、X'Y' (Z') N_1 、の官能性テイル（tail）に化合物しており、1 つのジェネレーションの反復単位の Z' 基の各々は、来端のジェネレーションに到達するまで、次のジェネレーションの反復単位の官能性テイルに結合している。

デンドリマーの分子において、反復単位は单一のジェネレーション内

で同一であるが、ジェネレーションごとに異なることができる。反復単位、X'Y' (Z') N_1 において、X' は第 1 ジェネレーションの反復単位の官能性テイルを表わし、Y' は第 1 ジェネレーションを構成する部分を表わし、Z' は第 1 ジェネレーションの反復単位の多官能性ヘッド（head）の官能基を表わし、そしてコアの化合物、① (Z') N_0 、または他のジェネレーションの官能基と同一であるか異なることができる；そして N_1 は 2 またはそれより大きい、好ましくは 2、3 または 4 の数であり、これは第 1 ジェネレーションにおける反復単位の多官能性ヘッドの多官能性を表わす。一般に、反復単位は式 X'Y' (Z') N_1 によって表わされ、式中「1」は第 1 から 1 ジェネレーションまでの種定のジェネレーションを表わす。こうして、好ましいデンドリマー分子において、第 1 ジェネレーションの反復単位の各 Z' は第 2 ジェネレーションの反復単位の X' に結合しており、そしてジェネレーションを通して進行して、ジェネレーションの数「1」における反復単位 X'Y' (Z') N_1 についての各 Z' 基はジェネレーションの数「1 + 1」の反復単位のテイル (X'Y') に結合している。好ましいデンドリマー分子の最後または来端は来端単位、X'Y' (Z') N_1 からなり、式中には来端のジェネレーションを表わし、そして X'、Y'、Z' および N_1 は X'、Y'、Z' および N_1 と同一であるかあるいは異なることができ、ただし Z' 基に結合した直連するジェネレーションは存在せず、そして N_1 は 2 より小さく、例えば、0 または 1 であることができる。したがって、好ましいデンドリマーは、

$$\langle \langle ① (Z') N_0 \rangle \rangle = \left\{ \left(X' Y' (Z') N_1 \right)^{N_0} \right\}_{N_0 N_1^{N_0}}$$

1 は 1 - 1 - 1 であり、そして記号は前に定義した通りである、によって表わされる分子式を有する。Π 関数はその規定された限界の間のすべての値の積である。こうして、

$$\prod_{n=1}^{N_0} N_n = (N_1^1)(N_2^2)(N_3^3) \cdots (N_{N_0}^{N_0})(N_{N_0+1}^{N_0+1})$$

は 1 つの樹枝状の枝の第 1 番目がジェネレーションからなる、反復単位、X'Y' (Z') N_1 の数であり、そして 1 が 1 であるとき、

$$n^0 = 1$$

$$n = 1 \quad .$$

コポリマーのデンドリマーにおいて、1 つのジェネレーションのために反復単位は少なくとも 1 つの他のジェネレーション中の反復単位から異なる。好ましいデンドリマーは、下に記載する構造式に示すように非常に対称である。好ましいデンドリマーは他の試薬との接触によって官能化されたデンドリマーに転化することができる。例えば、酸塩化物との反応によって来端のジェネレーション中のヒドロキシルのエステルへの転化は、エステル来端官能化デンドリマーが得られる。この官能化は利用可能な官能基の数によって規定される理論的最大まで実施する必要はない。こうして、官能化されたデンドリマーは、好ましいデンドリマーの場合におけるように、非常に高い対称性または精確に規定された分子式を有しないことがある。

ホモポリマーのデンドリマーの場合において、反復単位、X'Y' (Z')

N_1 のすべては同一である。すべての N_1 の値は等しい（N_r として定義して）ので、反復単位の数を表わす積の関数は簡単な指数の形になる。したがって、分子式は次のようにいっそ簡単な式で表わすことができる：

$$\langle \langle ① (Z') N_0 \rangle \rangle = \left\{ \left(X' Y' (Z') N_1 \right)^{N_0} \right\}_{N_0}^{N_1^{N_0}}$$

式中、1 - 1 - 1 である。

この形は、なお、各々が N_0 N_1^{N_0-1} 反復単位、X'Y' (Z') N_1 から成る、異なるジェネレーションの間の区別を示す。ジェネレーションを 1 つ項に結合すると、次が得られる：

$$\langle \langle ① (Z') N_0 \rangle \rangle = \left(X' Y' (Z') N_1 \right)_{N_0}^{N_0} \frac{N_0 (N_0 - 1)}{N_0 - 1} \left(X' Y' (Z') N_1 \right)_{N_0}^{N_0}$$

または

$$\text{コア} \left\{ \left(X' Y' (Z') N_1 \right)_{N_0}^{N_0} \frac{N_0 (N_0 - 1)}{N_0 - 1} \left(X' Y' (Z') N_1 \right)_{N_0}^{N_0} \right\}_{N_0}$$

式中、X'Y' (Z') N_1 はすべてのジェネレーションにおける使用する反復単位である。

結局、ポリマー化合物がこれらの上の式に適合する場合、ポリマーはスター-バーストポリマーである。逆に、ポリマー化合物がこれらの上の式に適合しない場合、ポリマーはスター-バーストポリマーではない。また、ポリマーがスター-バーストポリマーであるか否かを決定するため、

特表昭63-501876 (12)

それを調製するために用いた方法を知る必要はなく、それが上の式に合致するかどうかのみを知ればよい。これらの式は、また、デンドリマーのジェネレーション (G) または列形成 (Lining) を立証している。

明らかのように、P * M のアソシエーションが起こる方法および場所に依存する、因子 (M) 対デンドリマー (P) の比を決定するためにいくつかの方法が存在する。内部のカプセル化が存在するとき、M : P の重量比は通常 10 : 1、好ましくは 8 : 1、より好ましくは 5 : 1、最も好ましくは 3 : 1 である。この比は 0.5 : 1 ~ 0.1 : 1 程度に低いことができる。内部の化学量論を用いるとき、M : P の重量比は内部にカプセル化についてと同一である。外部の化学量論を用いるとき、M : P のモル/モルの比は次の式によって与えられる：

M	:	P
(A) 5	NcNtNr ⁿ⁻¹	1
(B) 3	NcNtNr ⁿ⁻¹	1
(C) 1	NcNtNr ⁿ⁻¹	1

ここで Nc はコアの多密度を意味し、Nt は末端基の多密度を意味し、そして Nr は枝の接合の多密度を意味する。NcNtNrGⁿ⁻¹ の項は Z 基の数を生ずるであろう。こうして、例えば、上の (A) は蛋白質、酵素または高度に帯電した分子が表面に存在すると、生ずることができ、上の (B) はそれがアスピリンまたはオクタケン酸であるとき、生ずることができ、そして上の (C) は表面のエスチル基をカルボキシレートのイオンまたは基に転化するとき、生ずることができる。

もちろん、種々のデンドリマーの他の構造体は、専業者によれば、使用するデンドリマーの成分およびジェネレーションの数を適当に変化さ

ることによって容易に調製できる。IgG 抗体に関する 3 つの異なるデンドリマーの系列のおおまかに目盛り定めした比較は、第 3 図に示されている。第 3 (B) 図によって示されている図面の系列はステーパーストボリアミドアミン (PAMAM) を示し；11 によってステーパーストボリエーネル (PE) を示し；そして 111 によってステーパーストボリエレンイミン (PE I) を示す。第 1 図のそれに類似する方法において、すべての 3 つの系列 (1, 11 および 111) は開始コアを示すそれらの一一番左の図面を有し、その左から次の図面はスター・ブランチ (starbranch) オリゴマーを示し、そして残りの図面はステーパーストボリエーネルおよびそれぞれのスター・バースト架橋デンドリマーを示す。これらの系列の目盛り図面において、デンドリマーが IgG 抗体第 3 (A) 図について認められているものに密接することが理解できる。IgG 抗体は第 3 図において一番左に示されている。目盛は 1 mm - 3.5 A¹ である。第 3 (A) 図において、変動可能な領域は (A) で示されている；一定の領域は (B) によって示されている；そして炭水化物の取り付け部位は (C) によって示されている。第 3 図上に示されるおおよその固定値は、(1) が 3.5 ~ 4.0 A¹ であり；(2) が 7.0 A¹ であり；そして (3) が 8.0 A¹ である。これらの寸法の性質は、ターゲティングが血管系からの出ることを含む場合に好ましい。したがって、1.25 オンストローム単位またはそれより小さいデンドリマーの直径は、通常のまたは意のある毛管によって供給されるターゲッチャッド器官から出ることを可能とするので、とくに好ましい。これらの寸法は、潜在的なターゲティング成分、例えば、抗体の大きさに比較して小さいということにおいて意味がある (第 3 図)。匹敵する分子量の粒状のポ

リマーは、旋回の半径 (その完全に延長した形態で) を有し、それは同一分子量のデンドリマーよりも非常に大きいであろう。このタイプの線状ポリマーは、多くの受入れられたターゲティング成分の分子の認識性質に悪影響を及ぼすことが期待されるであろう。また、コンジュゲートは、例えば、Fab, Fab' または他の適当な抗体断片を低分子体積のデンドリマーにカップリングすることによって、遊出 (extravasation) をディスカレッジ (discourage) しないように、最小の分子量をもつことが望ましい。

デンドリマーは、小さい体積の空間内のある数の金属イオンをキレート化する能力をもつため、放射性核種または強く常磁性の金属イオンを腫瘍部位に放出するための望ましい。腫瘍に対して特異的な抗体または抗体断片へのカップリングは、抗体に対して单一の修飾で、抗体当たりある数の金属を放出することができる。

標的ディレクター (target director) をデンドリマーへ連結することは、本発明の他の面である。本発明の好ましい実施態様において、とくに抗体を標的ディレクターとして使用する場合、反応性官能基、例えば、カルボキシル、スルフヒドリル、反応性アルデヒド、反応性オレフィン系誘導体、イソチオシアナート、イソシアナート、アミノ、反応性アリールハライド、または反応性アルキルハライドをデンドリマーについて便利に用いることができる。反応性官能基は、既知の技術、例えば、次の技術を使用してデンドリマーに導入することができる：

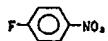
(1) 異なる反応性の官能基を内部に組込んで有するヘテロ官能性開始剤 (デンドリマーを合成するための出発物質として) の使用。このようなヘテロ官能性開始剤において、官能基の少なくとも 1 つはデンドリ

マーの形成のための開始部位として働き、そして他の官能基の少なくとも 1 つは標的ディレクターへの連結に利用可能であるが、デンドリマーの合成を開始するために使用可能である。例えば、保護されたアニリンの使用は、アニリンの NH₂ を反応させないで、分子内の NH₂ 基のそれ以上の修飾を可能とする。

標的ディレクターへの連結に利用可能である官能基は、3 つの形態の 1 つにおいて開始剤分子の一部であることができる；すなわち：

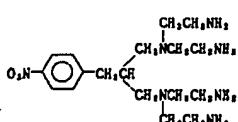
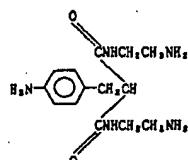
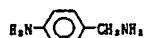
- (a) それを標的ディレクターとの連結において使用する形態において。これは、デンドリマーの合成に含まれる合成の工程のいずれもこの中心において反応を生じることができないとき、可能である。
- (b) ターゲティングディレクターへの連結のために使用した官能基がデンドリマーの合成に含まれる合成工程において反応性であるとき、それは保護基を使用することによって保護することができ、その保護基は含まれる合成の手順に対してその基を非反応性とするが、それ自体高分子の残部の一體性を変更しない方法で容易に除去できる。
- (c) ターゲティングディレクターとの連結のために使用すべき反応性の官能性のために簡単な保護基を形成できない場合、デンドリマーの合成において使用する合成手順のすべてにおいて非反応性である合成の前駆体を使用することができる。合成が完結したとき、この官能基は、この分子の残部の一體性を変更しない方法で、所望の連結基に容易に転化することができなくてはならない。

(2) 所望の反応性官能基を前もって形成したデンドリマー上にカップリング(共有的に)するとき、使用する試薬はデンドリマーの末端官能基と容易に反応する官能性を含有しなくてはならない。ターゲティング因子と連結するために究極的に使用すべき官能基は、その最終の形態において、保護された官能性として、あるいは合成の前駆体として存在することができる。この連結官能性を使用する形態は、利用すべき合成手段の間のその一體性、およびこの基を連結のために利用可能とするために必要な条件下最終の高分子が耐えることのできる能力に依存する。例えば、PE Iについて好ましいルートは、



を使用する。

上の(1)において使用するためのヘテロ官能性開始剤の例は、次の例を含む：

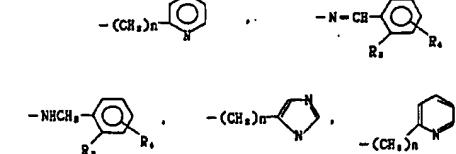


とくに重要ないくつかの化学が存在する：

- 1) スターバーストポリアミド(「PAMAM」)の化学；
- 2) スターバーストポリエチレンイミン(「PE I」)の化学；
- 3) PAMAMの表面をもつスターバーストPE I化合物；
- 4) スターバーストポリエーテル(「PE J」)の化学。

デンドリマーの表面の官能性の修飾は、他の有用な官能基、例えば、次のものと提供できる：

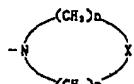
$-OPO_3H_2$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-PO_3H^-$ 、 $-PO_3^{2-}$ 、 $-CO_3^{2-}$ 、
 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^{-1}$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_3^{2-}$ 、 $-NR^1R^2$ 、 $-R^1$ 、
 $-OH$ 、 $-OR^1$ 、 $-NH_2$ 、ペーフルオロアルキル、 $-CNHR^1$ 、
 $-COOH$ 、



式中、

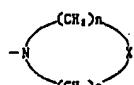
Rはアルキル、アリールまたは水素を表わし、

R'はアルキル、アリール、または



を表わし、

R'はアルキル、アリール、または



を表わし、

R'は-OH、-SH、-COOH、-SO3H、または-SO2Hを表わし、

R'はアルキル、アリール、アルコキシ、ヒドロキシル、メルカプト、カルボキシ、ニトロ、水素、ブロモ、クロロ、ヨード、またはフルオロを表わし、

R'はアルキルを表わし、

XはNR'、OまたはSを表わし、そして

nは1、2または3の整数を表わす；

ポリエーテル；または他のイムノ不感受性部分。

官能基の選択は、デンドリマーを設計するための特定の最終用途に依

特表昭63-501876 (14)

存する。

抗体のデンドリマーへの連結は本発明の他の面である。典型的には、抗体または抗体断片は、この分野においてよく知られている技術により、例えば、デンドリマー上の官能基と抗体または抗体断片中に存在する部分、例えば、炭水化物、アミノ、カルボキシルまたはスルフヒドリル官能性との間の結合によって、デンドリマーへ連結することができる。ある場合において、結合基はデンドリマーと抗体または抗体断片との間のコネクターまたはスペーサーとして使用できる。抗体または抗体断片へのデンドリマーの取り付けは、抗体または抗体断片の免疫活性を損傷の妨害しない方法で、すなわち、抗原認識部位および結合部位の一部でない抗体または抗体断片中の官能性を介して、抗体または抗体断片を結合することによって実現すべきである。

次の実施例により、本発明をさらに説明するが、本発明の範囲を限定するものと解釈すべきではない。文字の実施例は出発物質の調製に關し、そして数字の実施例は生成物の調製に關する。

実施例A

2-カルボキシアミド-3-(4'-ニトロフェニル)-プロパンアミドの調製

2-ニトロベンジルマロン酸トジエチルエステル(2.4g, 8.13ミリモル)を35mlのメタノール中に溶解した。この溶液を50~55℃に搅拌しながら加熱し、そして無水アンモニアの流れをこの溶液を通して8時間泡立てて通入した。この溶液を冷却し、白色の凝縮した生成物をろ過し、そして22.5mlの沸騰するメタノールから再結晶化すると、1.85g(7.80ミリモル)のビスマイドが96%の収率で得

られた(融点=235, 6℃(分解))。

構造はMS、1Hおよび13C NMR分光分析によって確認された。

分析: C₁₁H₁₂O₂Nについて計算

C H N

理論値: 50.63 4.89 17.72

計算値: 50.75 4.81 17.84

実施例B

1-アミノ-2-(アミノメチル)-3-(4'-ニトロフェニル)

プロパンの調製

2-カルボキシアミド-3-(4'-ニトロフェニル)プロパンアミド(2.0g, 8.43ミリモル)を、35mlの乾燥テトラヒドロフラン中で窒素の雰囲気下に搅拌しながらスラリー化した。この混合物にボラン/テトラヒドロフラン錯体(10.8ml, 10.6ミリモル)を注射器で添加した。次いで、この反応混合物を48時間還流加熱し、その間搅拌したアミドは溶解した。この溶液を真空冷却し、そしてテトラヒドロフランを回転蒸発器で真空除虫した。粗生成物およびボランの残留物を無水塩化水素ガスでバージした。この溶液を1時間還流し、そして溶媒を真空除虫した。粗製の塩酸塩を1.5mlの脱イオン水中に溶解し、2×50ml部分の塩化メチレンで抽出した。水性相を水浴中でアルゴンのブランケットの下で冷却し、そして50%の水酸化ナトリウムを塩基性pH=11.7となるまでゆっくり添加した。塩基性の水相を4×2.5mlの部分の塩化メチレンで抽出し、そしてこれらの一部にした抽出液を回転(回転)すると、1.45gの琥珀色の油が得られた。こお油をジエチルエーテル(50ml)で粉砕し、そして細いシリカゲル(等級82ア

ルドリッヒ)カラムを通して加圧下にろ過した。このカラムを100mlのエーテルで洗浄し、そして一緒にしたろ過を真空蒸発すると、1.05g(5.02ミリモル)の氨基ジアミンが透明な油として得られた(融点=275~278℃(分解)ビスHCl塩)。

構造はMS、1Hおよび13C NMR分光分析によって確認された。

分析: C₁₁H₁₂N₂O₂Cl₂について計算

C H N

理論値: 42.57 8.07 14.89

計算値: 43.00 8.14 15.31

実施例C

1-アミノ-2-(アミノメチル)-3-(4'-アミノフェニル)

プロパンの調製

ボラン/テトラヒドロフラン溶液(7.0ml, 7.0ミリモル)を、4-アミノ-2-ベンジルマロンアミド(1.5g, 7.24ミリモル)を含有するフラスコに搅拌しながらカニューレで窒素下に添加した。この溶液を40時間還流させた。無色の溶液を冷却し、そして過剰のテトラヒドロフランを回転蒸発によって除虫すると、透明なゼラチン様物質が得られた。メタノール(50ml)をこの油に注ぎて添加し、ガスの発生が認められた。乾燥塩化水素をこの懸濁液中に泡立てて通入して溶解を実施し、次いでこの溶液を1分間還流した。メタノール/HClを回転蒸発し、そして溶離される塩酸塩を同一の溶解/還流手順に再び通した。得られた塩酸塩を1.0mlの水中に溶解し、そして水浴中でアルゴン下に冷却した。無水塩化ナトリウム(5.0%)を搅拌しながらゆっくり添加してpH=11にした。次いで、この水溶液を2×100mlの部分のクロ

ロホルムで抽出し、これらと一緒にし、そして乾燥せずに細いシリカゲルのプラグを通してろ過した。溶媒を真空(回転)除去すると、標題化合物(0.90g, 5.02ミリモル)が70%の収率で得られた(Rf=0.65-CHCl₃/MeOH/NH₃OH混-2/2/1)。この構造はMS、1Hおよび13C NMRによって確認され、そしてそれ以上精製しないで使用した。

実施例D

8-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,

7-ジオキソウンデカンの調製

4-アミノ-2-ベンジルマロン酸メチルエ斯特(2.03g, 8.43ミリモル)を1.0mlのメタノール中に溶解した。この溶液を1.0mlのメタノール中の新しく蒸留したエチレンジアミン(6.00g, 10.34ミリモル)の搅拌した溶液に、窒素下に2時間かけて滴々添加した。この透明溶液を4日間搅拌し、そして薄層クロマトグラフィー(TLC)分析はジエチル(Rf=0.91)がビスマイド(Rf=0.42-2.0%の濃NH₃OH/8.0%のエタノール)に完全に転化したこと示した。この物質は強くニンヒドリン陽性であった。メタノールおよび過剰のジアミンを回転蒸発器で除虫し、そして得られた白色固体を一夜真空(1.0⁻²mm, 50℃)乾燥すると、粗生成物(2.45g, 8.36ミリモル)が88%の収率で得られた。分析試料をクロロホルム/ヘキサンから再結晶化した。融点160-161℃。質量分析、1Hおよび13C NMRのデータは提案する構造と一致した。

実施例E

メチルアジリジンと1-アミノ-2-(アミノメチル)-3-(4-

特表昭63-501876 (16)

ニトロフェニル プロパンとの反応

1-アミノ-2-(アミノメチル)-3-(4-ニトロフェニル)プロパン (400mg, 1.91ミリモル, >96%の純度) を、10.5mlの無水エタノール中に直素下に溶解した。メシルアジリジン (950mg, 7.85ミリモル) を攪拌したジアミン溶液に固体として添加した。得られた反応混合物を25°Cで14時間磁気搅拌機を使用して攪拌し、そしてこの期間の間に白色のゴム状反応溶液がフラスコの側面に形成した。エタノールをデカンテーションし、そして残留物を他の1.5mlの部分のエタノールで粉砕して未反応のアジリジンを除去した。ゴム状生成物を真空 (10⁻¹mm, 25°C) 乾燥すると、テトラキスメチルスルホンアミド (1.0g, 1.44ミリモル) が75%の収率 ($R_f = 0.74$ -NH₂OH/エタノール-20/80) で得られた。構造はMS、¹Hおよび¹³C NMRによって確認された。

実施例F

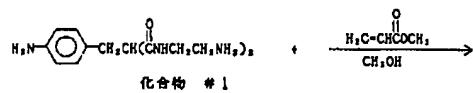
2-(4-ニトロベンジル)-1,3-(ビス-N,N-アミノエチル)ジアミノプロパンの調製

粗製メチルスルホンアミド (650mg, 0.94ミリモル) を5mlの直素でバージした溶媒 (98%) 中に溶解した。この溶液を直素下に攪拌し、そして143~146°Cで27分間激烈に攪拌しながら加熱した。わずかの暗色化が認められ、そして冷却した溶液をエーテル (8.0ml) の攪拌した溶液中に注いだ。沈殿した白色塩ケータをろ過し、そして1.0mlの脱イオン水中に直ちに溶解した。この溶液のpHを5.0%のNaOHでアルゴン下に冷却しながらpH=1.1に調節した。得られる溶液を9.0mlのエタノールと混合し、そして沈殿した無機塩をろ過した。

溶媒を粗製アミンから減圧下に除去し、そしてこの得られた淡褐色の油に19.0mlのトルエンを直素下に添加した。この混合物を激しく攪拌し、そして搅拌するトルエンが淡黄色を獲得するまで (ボット中に30~40mlが残留する) 水を共沸蒸留 (ディーン-スタークのトラップ) により除去した。トルエンを冷却し、そして暗色の取扱いにくい残留物および塩からデカンテーションした。この溶液から溶媒を真空ストリッピングし、そして得られる淡黄色の油を一夜真空乾燥 (0.2mm, 35°C) すると、210mgの生成物 (80%) が得られ、これをMS、¹Hおよび¹³C NMRによって特性づけた。

実施例G

次の反応式によって表わされる1,5ジェネレイションのスターバーストポリマー (アニリン部分を含有する) の調製

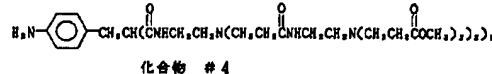


メチルアクリレート (2.0g, 24ミリモル) をメタノール (15ml) 中に溶解した。化合物8-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソクサンデカン (1.1g, 3.8ミリモル) (すなわち、化合物#1) をメタノール (10ml) 中に溶解し、

化合物#3) がオレンジ色のガラス状固体として得られた。

実施例H

次の反応式によって表わされる1,5ジェネレイションのスターバーストポリマー (アニリン部分を含有する) の調製



アミン (化合物#3) (2.7g, 3.63ミリモル) をメタノール (7ml) 中に溶解し、そしてメタノール (1.5ml) 中のノマルアクリレート (3.8g, 44ミリモル) の攪拌した溶液に周囲温度において1時間かけてゆっくり滴加した。この溶液のわずかの加温が溶液を回転蒸発器で40°Cにおいて除去した。すべての溶媒および過剉のノマルアクリレートの除去後、エステル (化合物#4) が4.5gの収量でオレンジ油として得られた。

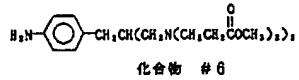
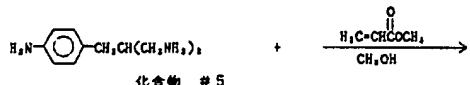
実施例I

次の反応式によって表わされる1,5ジェネレイションのスターバーストポリマー (アニリン部分を含有する) の調製



エステル (化合物#2) (2.6g, 3.7ミリモル) をエタノール (100ml) 中に溶解した。これをエチレンジアミン (250g, 4.18ミリモル) およびメタノール (100ml) の激烈に攪拌した溶液に、温度が40°Cを超えないような速度で、注意した點加した。点加の完結後、この反応混合物を35~40°C (加熱マントル) で28時間攪拌した。28時間後、赤外分光分析によってエステル基は検出できなかった。溶媒を回転蒸発器で60°Cにおいて除去した。トルエン-メタノール-エチレンジアミンの3成分共沸蒸留によって、過剰のエチレンジアミンを除去した。最後にすべての残留するトルエンをメタノールとともに共沸蒸留した。すべてのメタノールを除去すると、3.01gの生成物 (化

特表昭63-501876(16)



化合物 # 6

トリアミン（化合物 # 5、この化合物の説明は実施例 C に示されている）（0.42 g、2.3 ミリモル）をメタノール（10 ml）中に溶解し、そしてメタノール（10 ml）中のメチルアクリレート（1.98 g、2.3 ミリモル）に 1 時間かけて滴々添加した。この混合物を周囲温度で 48 時間攪拌した。溶液を 40 °C より高くなる温度に維持した回転蒸発器で除去した。過剰のメチルアクリレートを反復したメタノールとの共沸蒸留によって除去した。エステル（化合物 # 6）はオレンジ色油（1.24 g）として単離された。

実施例 K

次の反応式によって表わされる 1 ジェネレイションのスター-バースト

ポリマー（アニリン部分を含有する）の調製



化合物 # 7

し、次いでメタノールとの共沸蒸留を反復すると、すべての過剰のメチルアクリレートを除去できた。真空ポンプで 48 時間ポンピングすると、エステル（化合物 # 8）がオレンジ色油（2.58 g、1.8 ミリモル）として単離された。

実施例 M

4.5 ジェネレイションのデンドリマーの加水分解およびカルシウム塩の調製

4.5 ジェネレイションの PAMAM（エステル末端、NH₂で開始された）（2.11 g、10.92 モル当量）を 25 ml のメタノール中に溶解し、そしてこれに 10% の NaOH（4.37 ml、10.92 モル当量）（pH = 11.5~12）を添加した。室温で 24 時間後、pH は約 9.5 であった。さらに 20 時間後、この溶液を回転蒸発し、50 ml のトルエンを添加し、そして再び回転蒸発した。

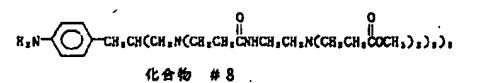
得られる油を 25 ml のメタノール中に溶解し、そして 7.5 ml のジェチルエーテルを添加すると、白色ガムとして沈殿した。固体をデカンションし、そしてガムを回転蒸発すると、非常に微細な灰色の粉末が得られ、これをさらに乾燥すると、2.16 g の生成物（9.8% の収率）が得られた。エステル基は NMR および赤外分析で発見されなかった。

4.5 ジェネレイションの PAMAM のナトリウム塩（エステル末端、NH₂で開始された）をカルシウム塩の代わりに使用した。このナトリウム塩（1.03 g）を 100 ml の水中に溶解し、そして中空線錠の透析チューブ（カットオフ = 5000）に 3 ml / 分で通過させた。チューブの外側は 5% の CaCl₂ 溶液中に浸漬した。次いで、この手順を反復した。

エステル（化合物 # 6）（1.24 g、2.3 ミリモル）をメタノール（50 ml）中に溶解し、そしてメタノール（100 ml）中のエチレンジアミン（73.4 g、1.22 モル）に 2 時間かけて滴々添加した。わずかの発熱が認められ、激しい搅拌を維持した。この溶液を周囲温度で 72 時間攪拌したまま放置した。溶液を回転蒸発で 60 °C において除去した。トルエン-メタノール-エチレンジアミンの 3 成分共沸蒸留によって、過剰のエチレンジアミンを除去した。最後に、すべての残留するトルエンをメタノールとともに除去し、次いで真空ポンプで 48 時間トルエンでポンピングすると、アミン（化合物 # 7）（1.88 g）が黄色／オレンジ油として得られた。

実施例 L

次の反応式によって表わされる 1.5 ジェネレイションのスター-バーストポリマー（アニリン部分を含有する）の調製



化合物 # 8

アミン（化合物 # 7）（1.45 g、微量のメタノールが残留した）をメタノール（100 ml）中に溶解し、そしてメタノール（20 ml）中のメチルアクリレート（5.80 g）の搅拌した溶液に 1.5 時間かけてゆっくり添加した。この溶液を室温で 24 時間攪拌した。溶液を除去

得られた溶液を再び透析し、この時は水に対して透析し、次いでさらに 2 回反復した。

蒸発する 0.8 g の残った固体が得られ、これをメタノール中に對して（完全には可溶性ではない）そして乾燥すると、0.45 g の灰色結晶が得られた。



計算値 - 10.10% の Ca⁺⁺

不溶 = 952.6. 3 計算値 = C - 44.32. 1, H - 6.01. 8, O - 22.55. 9

理論値: C - 46.5, H - 8.32, N - 13.38, Ca - 10.10

実測値: C - 47.3, H - 7.00, N - 13.55, Ca - 8.83

実施例 N

末端カルボキシレート基をもつデンドリマーの調製

4.5 ジェネレイションのスター-バーストポリアミドアミンを加水分解して、それらの末端メチルエステル基をカルボキシレートの酸化した。これにより、周辺に分散した酸性の電荷をもつ、回転円錐形の分子が発生した。加水分解したデンドリマーは 0.5 ジェネレイション（3 カルボキシレート）ないし 6.5 ジェネレイション（192 カルボキシレート）の範囲であった。

生成物は Na⁺、K⁺、Ca⁺⁺または Rb⁺として発生させることができた。

実施例 O

N-*t*-ブロトキシカルボニル-4-アミノベンジルマロネートジメチ

特表昭63-501876(17)

ルエスケル

4-アミノマロネートジメチルエスケル(11.62g, 49ミリモル)を、50mlのt-ブタノール:水(60:40)中に搅拌しながら溶解した。ジ-レーブトキシジカルボネット(19.78g, 90ミリモル)を添加し、そしてこの反応混合物を一夜搅拌した。ブタノールを回転蒸発器で除去すると、水中の生成物の黄色懸濁液が得られた。塩化メチレン中に抽出し、乾燥(MgSO₄)そして蒸発すると、黄色油(21.5g、ジ-レーブトキシジカルボネットで汚染されている)が得られた。2-プロパンオール:水(75:25)から再結晶化すると、淡黄色結晶(11.1g, 33ミリモル、87%)が得られた。この¹³C NMRによって確認され、そして純度はHPLC分析【スフェリソープ(Spherisorb) ODS-1, 0.05モルのH₃PO₄, pH 3:CH₂CN 55:45】により検査した。この材料をそれ以上精製しないで使用した。

実施例P

N-t-ブトキシカルボニル-8-(4-アミノベンジル)-1,4-B, 11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカン
N-t-ブトキシカルボニル-4-アミノベンジルマロネートジメチルエスケル(8.82g, 25ミリモル)、実施例Oにおけるように調製した、を50mlのメタノール中に溶解した。この溶液を、新しく蒸留したエチレンジアミン(18.8g, 3.13ミリモル)および20mlのメタノールの溶液、室温密閉気下に攪拌(2時間)後々添加した。この溶液を24時間搅拌した。エチレンジアミン/メタノール溶液を回転蒸発器で除去した。生成物をメタノール中に溶解し、そしてトルエンを添

加した。溶液を回転蒸発器で除去すると、素生成物が白色固体(10.70g、エチレンジアミンで汚染されている)が白色固体として得られた。この試料を2つの試料に精製のために分割した。トルエンとともにエチレンジアミンを共沸蒸留除去し、シンプル中にスルホン化イオン交換ビーズを含むソクスレー抽出器を使用してエチレンジアミンを除去すると、生成物は部分的に分解して褐色油が得られた。残留する生成物はトルエンから冷却すると白色固体として析出された(2.3g、ほぼ50%)。メタノール中の10%溶液をガスクロマトグラフィー(カラム、テナクス60/80)により分析すると、試料中にエチレンジアミンは検出限界であった(<0.1%)。第2分画をメタノール中に溶解して10質量%の溶液を形成し、そしてエチレンジアミンから溶液としてメタノールして逆浸透することによって精製した。【使用した膜はフィルムテク(Filmtec) FT-30、アミコン(Amicon) TC1Rの薄いチャンネルのセパレーター、エチレンジアミンはこの膜を横切る。】生成物は白色固体(2.7g)として単離され、この中に検出可能な量のエチレンジアミンはガスクロマトグラフィーによって発見できなかった。¹³C NMRのデータおよびHPLC分析(スフェリソープODS-1, 0.05モルのH₃PO₄, pH 3:CH₂CN 55:45)は提案した構造と一致した。この生成物をそれ以上精製しないで使用した。

実施例Q

N-t-ブトキシカルボニル-8-(4-アミノベンジル)-1,4-B, 11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカンからの0.5ジエチネオレイションのスターバーストデンドリマーの調製
N-t-ブトキシカルボニル-8-(4-アミノベンジル)-1,4-

8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカン(5.0g, 13ミリモル)、実施例Pにおけるように調製した、を100mlのメタノール中に溶解した。メチルアクリレート(6.12g, 68ミリモル)を添加し、そしてこの溶液を周囲温度で2時間搅拌した。この反応をHPLC(スフェリソープODS-1、アセトニトリル:0.04モルの酢酸アンモニウム 60:40)によって監視して、所望生成物への転化を最適化した。この溶液を30%の固体に濃縮し、そしてメチルアクリレートA(3.0g, 32ミリモル)を添加した。この反応混合物を周囲温度で、アルキル化生成物がHPLCによって検出できなくなるまで(24時間)、搅拌した。溶液を30°Cで回転蒸発によって除去し、そして1mmHgで24時間ポンピングすると、生成物が黄色粘性油として得られた、収量7.81g。¹³C NMRデータは提案する構造と一致した。生成物はそれ以上精製しないで使用した。

実施例R

N-t-ブトキシカルボニル-8-(4-アミノベンジル)-1,4-B, 11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカンからの1ジエチネオレイションのスターバーストデンドリマーの調製
0.5ジエチネオレイションの生成物(実施例Q)(7.70g, 10.45ミリモル)を7.5mlのメタノール中に溶解し、そしてエチレンジアミン(4.00ml, 7.41モル)およびメタノール(5.0ml)の搅拌した溶液に2時間かけて滴々添加した。この反応混合物を周囲温度で48時間搅拌した。エチレンジアミンおよびメタノールを回転蒸発によって除去すると、黄色油(11.8g、エチレンジアミンで汚染されている)が得られた。生成物を90mlのメタノール中に溶解し、そして逆浸透(フ

ィルムテクFT-30膜およびアミコンTC1R薄いチャンネルのセパレーター、溶液としてメタノール)によってエチレンジアミンから精製した。48時間後、エチレンジアミンはガスクロマトグラフィー(カラム、テナクス60/80)によって検出できなかった。溶液を回転蒸発器によって除去し、真空ラインで24時間ポンピングすると、生成物は黄色ガラス状固体として得られた(6.72g)。HPLC(PLRP-Sカラム、アセトニトリル:0.015モルのNaOH, 10~20%の勾配、20分)による分析および¹³C NMR分析は、提案した構造と一致した。

実施例S

N-t-ブトキシカルボニル-8-(4-アミノベンジル)-1,4-B, 11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカンからの1.5ジエチネオレイションのスターバーストポリマーの調製
1ジエチネオレイションの生成物(実施例R)(2.14g, 25ミリモル)を12.5mlのメタノール中に溶解し、そして5mlのメタノール中のエチレンジアミン(3.5g, 39ミリモル)を添加した。この溶液を周囲温度で48時間搅拌し、反応の進行をHPLC(スフェリソープODS-1、アセトニトリル:0.04モルの酢酸アンモニウム 60:40)によって監視した。メチルアクリレートの第2アリコート(3.5g, 39ミリモル)を添加し、そしてこの反応混合物を周囲温度で72時間搅拌した。溶液を回転蒸発器で除去すると、生成物が黄色油(3.8g)として、真空ポンプによる一夜のポンピング後、得られた。この生成物をそれ以上精製しないで使用した。

実施例T

特表昭63-501876 (18)

N-1-ブトキシカルボニル-6-(4-アミノベンジル)-1,4,8,11-テトラアザ-5,7-ジオキソウンデカンからの2完全ジエチレインのスターバーストポリマーの調製

1.5ジエチレインの生成物(実施例S)(3.9g, 2.5ミリモル)を50mlのメタノール中に溶解し、エチレンジアミン(600g, 10モル)およびメタノール(50ml)の混合した溶液に2時間かけて滴々添加した。この溶液を周囲温度で直射日光下で8時間搅拌した。エチレンジアミン/メタノールを回転蒸発器で除去すると、黄色のガラス状固体(4.4g, エチレンジアミンで汚染されている)が得られた。この生成物の10%の溶液をメタノール中でつくり、そしてエチレンジアミンがガスクロマトグラフィー(カラム、テナクス60/80)によって検出されなくなるまで、逆浸透(フィルムテクツT-30として使用した膜、アミコンTC-1R薄いチャネルのセパレーター中)によってエチレンジアミンから精製した。溶液を除去すると、生成物は黄色のガラス状固体(3.52g)として得られた。¹³C-NMRデータおよびHPLC(PLRP-S、カラム、アセトニトリル:0.015NaOH, 10~20%の勾配、20分)は、提案した構造と一致した。

実施例U

2ジエチレインのスターバーストとプロモ酢酸とのメチレンカルボキシレート末端スターバーストデンドリマーを調製する反応

第2ジエチレインの生成物(実施例T)(0.22g, 0.13ミリモル)を1.5mlの脱イオン水中に溶解し、そして温度を40.5℃に平衡化した。プロモ酢酸(0.48g, 3.5ミリモル)および水

酸化リチウム(0.13g, 3.3ミリモル)を5mlの脱イオン水中に溶解し、そして反応混合物に添加した。反応のpHは、pHスタット(*stat*)(<0.1NのNaOHで測定)を使用して、40.5℃で一夜注意して0に維持した。逆相HPLC(スフェリソープODS-1、溶媒剤0.025モルのH₃PO₄, [NaOH]:アセトニトリル 85:15)の監視は、主として単一の成分の合成を確認した。

実施例V

イソチオシアノ酸化第2ジエチレインのメチレンカルボキシレート末端スターバーストデンドリマーの調製

5mlの2.8ミリモルの第2ジエチレインのメチレンカルボキシレート末端スターバーストデンドリマー(実施例U)を20mlの水で希釈し、そしてpHを接種酸で0.5に調節した。室温において1時間後、この混合物をHPLCにより分析して、ブトキシカルボニル基の除去を評価し、次いで50%の水酸化ナトリウムで処理してpHを7にした。pHスタット(*stat*)(<0.1NのNaOHによる測定)を使用してpH7に維持し、そして225μlのチオホスゲンを添加した。室温において15分後、この混合物のpHを1NのHClで5に調節した。この混合物をクロロホルム(20ml×2)で洗浄し、次いで減圧下に回転蒸発器で濃縮した。0.91gの回収された残留物はイソチオシアネットと塩類との混合物である。

実施例W

第2ジエチレインのスターバーストポリエチレンイミン-メタンスルホンアミドの調製

50mlのエタノール中の125gのN-メタンスルホニルアジリジン

の溶液に、25.0gのトリス(2-アミノエチル)アミンを添加した。この溶液を直温で4日間搅拌した。水を反応混合物に必要に応じて添加して、溶液の均一性を維持した。溶液を真空蒸留により除去すると、第2ジエチレインのスターバーストPEI-メタンスルホンアミドが黄色ガラス(161g)として得られた。

実施例X

第2ジエチレインのスターバーストポリエチレンイミンを形成するためのメタンスルホンアミドの切離し

20mlの3.8%のHCl中の5.0gの第2ジエチレインのスターバーストPEI-メタンスルホンアミド、実施例Yから、の溶液をガラスアンプル中に密閉した。このアンプルを160℃に16時間加热し、次いで冰浴中で冷却し、そして開いた。溶液を真空蒸発によって除去し、そして残留物を水中に溶解した。この溶液のpHを10より大または10に50%のNaOHで調節した後、溶液を真空蒸留によって除去した。トルエン(150ml)を残留物に添加し、そしてこの混合物をディーキスタークリッパの下に、水がもはや除去されなくなるまで、逐次加热した。この溶液をろ過して塩類を除去し、そしてろ液を真空蒸発すると、1.9gの第2ジエチレインのスターバーストPEIが黄色油として得られた。

実施例Y

第3ジエチレインのスターバーストポリエチレンイミン-メタンスルホンアミドの調製

100mlのエタノール中の10.1gのスターバーストPEI、実施例Xから、の溶液に、36.8gのN-メタンスルホニルアジリジンを

添加した。この溶液を直温で1週間搅拌した。水を必要に応じて添加して、この溶液の均一性を維持した。溶液を真空蒸留によって除去すると、第3ジエチレインのスターバーストPEI-メタンスルホンアミドが黄色ガラス(4.5, 3g)として得られた。

実施例Z

第3ジエチレインのスターバーストポリエチレンイミンを形成するためのメタンスルホンアミドの切離し

第3ジエチレインのスターバーストPEI-メタンスルホンアミド(5.0g)、実施例Yから、メタンスルホンアミド基を、実施例Xにおける第2ジエチレインの物質について記載したのと同一の手段によって除去して、2.3gの第3ジエチレインのスターバーストPEIを黄色油として得られた。

実施例AA

第3ジエチレインのスターバーストポリエチレンイミンと4-フルオロオニトロベンゼンとの反応

第3ジエチレインのスターバーストポリエチレンイミン(実施例Z)(1.08g, 1.2ミリモル)を1.2mlの無水エタノール中に溶解した。(4-フルオロ)-ニトロベンゼン(1.20ml, 1.2ミリモル)を添加し、そして反応混合物を一夜逐次加熱した。溶液を回転蒸発器で除去し、そして残った黄色を水中に溶解した。水溶液をクロロホルムで洗浄して、未反応の(4-フルオロ)-ニトロベンゼンを除去した。水を除去すると、生成物が深黄色油(0.80g)として得られた。¹³C-NMRスペクトルは提案した構造と一致した。(統計学的分布の性質を蒸留する試みをしなかった。)生成物はそれ以上精製しないで使用した。

特表昭63-501876 (19)

実施例BB

第3ジェネレイションのスター-バーストポリエチレンイミンのニトロフェニル誘導体とグリコロニトリルとの反応

第3ジェネレイションのスター-バーストポリエチレンイミンのニトロフェニル誘導体(AA)を、2.0mlの脱イオン水中に溶解した。水酸化ナトリウム(2.80g、5.0% / e)を搅拌した溶液に添加し、そしてこの溶液を窒素でバージし、水酸化ナトリウムのスクラバーを通して排出した。グリコロニトリル(2.85mlの7.0%の水溶液)を周囲温度において添加した。黄色の沈殿は数分後に形成することが観察された。2時間後、温度をゆっくりと昇温まで上昇させ、そして溶液を窒素でバージしながら還元温度に24時間維持した。水を除去すると、生成物はクリコール酸および水酸化ナトリウムで汚染された黄色固体として得られた。¹³C NMRスペクトルは提案した構造と一致していた。生成物は精製しないで使用した。

実施例CC

ニトロフェニル誘導体のアミノフェニルメチレンカルボキシレート末端第3ジェネレイションのスター-バーストポリエチレンイミンへの加水分解

実施例BBからの黄色固体(1.70g)を1.0mlの脱イオン水中に溶解し、生じた溶液のpHはほぼ1.1であった。木炭担持パラジウム(2.00gの5%Pd/C)を、ガラス製バール(Parr)びん中の反応混合物に添加した。反応混合物を40psi(27.5kPa)の水素圧下に置き、そしてバール水素化装置内で周囲温度において8時間振盪した。次いで、この反応混合物を0.5μmのミリポア(Millipore)フィルターでろ過し

てPd/Cを除去し、溶液を真空除去し、そしてバイオグル(Biozel)P2樹脂(2.5gの水溶液)でゲルろ過した。HClで酸性化すると、オレンジ褐色の溶液が生成し、これを窒素で一夜バージした。溶液を真空除去すると、生成物が淡黄色として得られ、これは淡褐色の固体(3.98g、NaClおよびグリコール酸で汚染されており、生成物の最大の理論量は1.15gであった)が得られた。生成物はそれ以上精製しないで使用した。

実施例DD

4-イソチオシアナトフェニルメチレンカルボキシレート末端第3ジェネレイションのスター-バーストポリエチレンイミンの調製

実施例CCからの生成物(3.98g)を1.5mlの水中に溶解し、そしてこの溶液のアリコート(2.5ml)を1.0mlの水で希釈した。この溶液のpHを水酸化ナトリウムで7に調節した。pHスタート(1NのNaOHで滴定)を使用してpHを維持し、そして200μlのチオホスゲンを添加した。10分後、この混合物のpHを塩酸で4に調節した。水を回転蒸発器で減圧下で除去した(少量のn-ブタノールを添加して発泡を防止した)。残留物を塩酸メチレンで洗浄し、次いで乾燥した。粗生成物(0.95g)すなわちイソチオシアネット(0.14g)と塩類との混合物はそれ以上精製しないで使用した。

実施例EE

メチレンカルボキシレート末端第2ジェネレイションのスター-バーストポリアミドアミンの調製

第2ジェネレイションのスター-バーストポリアミドアミン(2.71g、2.6ミリモル)およびプロモ酢酸(4.39g、31.5ミリモル)を3

0.0mlの脱イオン水中に溶解し、そしてpHを5NのNaOHでpHスタートを使用して9.7に調節した。この反応をこのpHに30分間維持し、そして温度を80°Cにゆっくりと昇温させ、80°Cに3時間一定のpHにおいて維持した。pHは1.0.3に上昇し、そしてこの反応混合物をpHスタートの倒立下に周囲温度において一夜維持した。反応混合物をさらに4時間還流させた後処理した。溶液を除去し、そして最後の微量の水をメタノールとともに共沸蒸留すると、生成物が淡黄色粉末(8.7g、異化ナトリウムで汚染されている)として得られた。¹³C NMRスペクトルは提案した構造と一致していた(多少のモノアルキル化の結果として、少量の欠陥物質のために多少の汚染を伴っていた)。

実施例FF

メチレンカルボキシレート末端第2ジェネレイションのスター-バーストポリエチレンイミンの調製(アンモニアから開始した)

第2ジェネレイションのスター-バーストポリエチレンイミン(2.73g、6.7ミリモル)、実施例Xから、およびプロモ酢酸(41.2g、8.1ミリモル)を3.0mlの脱イオン水中に溶解した。pHをpH9.5にゆっくりと昇温させ、温度を30°C以下に維持した。温度を5.5°Cにゆっくりと昇温させ、そして反応のpHをpHスタート(5NのNaOHで滴定)の助けにより9.5に8時間維持した。pHを10.2に上昇させ、そのpHに一夜維持した。溶液を回転蒸発器で除去し、そして最後の微量の水をメタノールを使用して共沸蒸留すると、生成物は黄色粉末(17.8g、異化ナトリウムで汚染されていた)として得られた。¹³C NMRスペクトルは提案した構造と一致していた(多少のモノアルキル化の結果として、少量の欠陥物質のために多少の汚染を伴っていた)。

実施例GG

3.5、4.5、5.5および8.5ジェネレイションのスター-バーストPAMAMの調製

2.46gの3ジェネレイションのスター-バーストPAMAMの1.0重量%のメタノール溶液に、2.32gのメチルアクリレートを添加した。この混合物を室温において4時間放置した。溶液および過剰のメチルアクリレートを除去した後、4.82gの生成物が回収された(理論量の105%)。

より高い1/2ジェネレイションのスター-バーストPAMAMの調製:

ジェネレイション4.5、5.5および8.5は、記載するように、反応成分の濃度、反応成分のモル比または反応時間を有意に変化させないで調製した。

実施例HH

4、5および6ジェネレイションのスター-バーストPAMAMの調製

2000gの前もって蒸留したエチレンジアミンに、5.4gの4.5ジェネレイションのスター-バーストPAMAMをメタノール中の1.5重量%の溶液として添加した。これを室温において48時間放置した。メタノールおよび過剰のエチレンジアミンの大部分を回転蒸発器によって水の吸引減圧下に50°C以下の温度で除去した。回収された生成物の合計重量は8.07gであった。ガスクロマトグラフィーは、生成物が、なお、この時点で34重量%のエチレンジアミンを含有することを示した。この生成物の5.94gを1.00mlのメタノール中に溶解し、そして限外ろ過して残留エチレンジアミンを除去した。ろ過はアミコンTCIRの深いチャンネル滤膜セパレーター、アミコンYM2膜を装備する、を使用

特表昭63-501876 (20)

して実施した。インクイン圧力開放弁を使用して、膜を横切って55psi (380kPa) の圧力を維持した。溶液をもっぱら膜を通して強制的に流すことによって、100mlをまず15mlに濃縮した。この最初の濃縮後、流れを体積レテンション (retentate) 再循環モードに18時間交換した。この時間後、60mlのメタノールを膜に上に通して、このモジュールおよび関連するチューブになお存在する生皮物を回収した。生成物から溶液をストリッピングし、そして2.35gの5ジエチレンのスターバーストPAMAMを回収した。ガスクロマトグラフィーによる分析は、0.3%のエチレンジアミンが生成物中に残留することを示した。

ジエチレンの濃度は、エチレンジアミン対出発物質の重量比をわずかに変更して、上のようにして実施した。第4ジエチレンを調製するため、この比は200:1であり、そして第6ジエチレンを調製するため、この比は730:1であった。

実施例1

2-(アセトキシ)安息香酸(アスピリン)のスターバーストデンドリマーへの組込み

「プローブ分子」がミセルの内部に含まれているかどうかを確認するための広く受け入れられている方法は、非ミセル化試料中の対ミセル化試料中のその炭素-13-スピニ格子緩和時間(T_1)を比較することである。ミセル化試料中の T_1 の実質的な減少は、ミセル中に「プローブ分子」が含まれていることを示す。スターバーストデンドリマーはミセルの「共有的に固定された」類似体であるので、この T_1 緩和時間の技術を使用して、種々の試薬学的タイプの分子がスターバーストポリアミド

アミンとアソシエーションする度合/程度を確認した。以下の実施例において、(アセトキシ)安息香酸(I) (アスピリン)についての T_1 値は、溶液(CDCl₃)中で決定し、次いで種々の[I:デンドリマー]のモル比においてCDCl₃中の T_1 値と比較した。

アスピリン(I)を種々のスター-バーストポリアミドアミンデンドリマー中にジエチレンの関数として含めること。

種々の0.5デンドリマー(エステル末端、NH₂から開始した)スター-バーストポリアミドアミンデンドリマー(G=0.5-5.5)を、CDCl₃中において2-(アセチルオキシ)安息香酸と一緒にして、段階第三アミンの比=1.0を得た。2-(アセチルオキシ)安息香酸についての T_1 値が添加したスター-バーストデンドリマーのプロット(参照第4図ここで、△はC-4を表わし、□はC-6を表わし、○はC-5を表わす)は、 T_1 が2-(アセチルオキシ)安息香酸において炭素4, 5および6について2.5-5.5のジエチレン範囲にわたって最小に到達することを示す。これはデンドリマー(G=2.5-5.5)において2-(アセチルオキシ)安息香酸のアソシエーションを立証し、そしてさらにポリアミドアミンデンドリマー(G=2.5またはそれより大)が粗体分子として機能することを確認する。

実施例2

スター-バーストデンドリマー-PAMAMからのブソイドエフェドリンの解放

ブソイドエフェドリン(0.83mg/ml)およびスター-バーストポリアミドアミンデンドリマー「1.0mg/ml; G=8.5; 条件(Z)=192(メチルエステル)」を脱イオン蒸留水中に溶解し、そして共存

体相のpHを水酸化ナトリウム溶液で9.5に調節し、そして温度において約12時間貯蔵した。ブソイドエフェドリン単独の溶液を同一の方法で処理した(対照)。最初の実験後、薬物デンドリマー溶液を40°Cで8時間貯蔵し、そして動的透析を実施した。使用した透析膜はスペクトル分離セル(半分のセル体積5および10ml、セル寸法: 両者のセルについて直徑3.8mmおよび、それぞれ、5および10mlのセルについて10および20mmのセル深さ)中のスペクトラン/ボル(Par)7、MWC O 1.000 28.6mm直徑であった。

試料をHPLCによって分析し、次のように、ブソイドエフェドリンについて展開した:

カラム: ウポンダバク(uBondapak) C-18

移動相: pH 3.2のリン酸塩緩衝液+アセトニトリル
(80:20)

流速: 0.3ml/min

検出: UV, 210nm

保持時間: 13.3分

透析膜を脱イオン水で洗浄し、そして使用前受容体相中で少なくとも12時間ソーキングして保持した。この透析膜を共存体および受容体の区画(compartments)の間に配置し、区画を小さい磁気回転棒で搅拌した。既知体積の共存体溶液および受容体溶液をそれぞれの区画の中に導入し、そしてブソイドエフェドリンの受容体区画への移動を時間の関数として追跡した。シンク(sink)条件を維持するために、全受容体相を周期的に(30分毎に)および新鮮な受容体相と置換した。ブソイドエフェドリンの量を試料採取した受容体相においてアッセイした。実験は

室温(22°C)において実施した。受容体相は淡水の(plain)脱イオン蒸留水であった。

動的分析の結果を第5図に示す。第5図において、△はブソイドエフェドリンのみ(対照)を表わし、□はブソイドエフェドリン+デンドリマーを表わし、○は透析前8時間40°Cにおけるブソイドエフェドリン+デンドリマーを表わす。明らかのように、G=6.5のデンドリマーの存在下に、共存体区画において、ブソイドエフェドリンの透析速度は減少する。共存体溶液を40°Cで貯蔵すると、透析速度はさらに減少するようと思われる。

実験をより低い濃度で反復した(薬物分子末端基の数はの比は同一に保持した)。G=6.5ジエチレン、120μl/mlのブソイドエフェドリン、100μl/mlの(122μl/mlの)の

このより低い濃度におけるブソイドエフェドリン(単独)の動的透析は、より高い濃度におけるそれにはほとんど同一であった。第6図は、この実験の結果を要約し、△はブソイドエフェドリンのみ(対照)を表わし、そして○はブソイドエフェドリン+デンドリマーを表わす。

実施例3

実施例2の手順を反復したが、ただし次の変更を用いた。

受容体相: pH 7.4のリン酸塩緩衝液

共存体相: pH 7.4のリン酸塩緩衝液+次の比の薬物およびデンドリマー:

1. G 6.5 : 薬物: : 1 : 192
2. G 5.5 : 薬物: : 1 : 96
3. G 4.5 : 薬物: : 1 : 48

4. G 6.5 H : 薬物 : : 1 : 192

5. G 5.5 H : 薬物 : : 1 : 96

6. G 4.5 H : 薬物 : : 1 : 48

上の共存体組の組成物+ブソイドエフェドリン単独を動的透析にかけた。デンドリマーのジェネレーションの後に文字「H」は、加水分解したデンドリマーを意味する。加水分解は実験例MおよびNに記載する手段によって達成した。

これらの実験の結果は第7図に要約しており、ここで共存体区画および受容体区画はpH 7.5のリン酸緩衝液を有する。ブソイドエフェドリン単独(P)について、これらの実験の平均曲線をプロットし(実線で示す)、他の実験からの1つの典型的な試験を示す。第7図において、次の記号は示したデンドリマーのデンドリマーを表す。

表III
記号 デンドリマーのデンドリマー

○ 5.5

● 6.5

○ 4.5

□ 5.5 H

○ 6.5 H

○ 4.5 H

ブソイドエフェドリンは、pH 7.4においてデンドリマー(加水分解されていない)とアソシエーションしないように思われる。末端の官能基をカルボキシレートの形態に加水分解すると、透析速度に劇的な結果が起こる(減少)。ジェネレーションの数は透析速度に影響を及ぼさない

ようと思われる。

実験例4

サリチル酸とPAMAMスター-バーストデンドリマーとの相互作用の研究

この実験例は、サリチル酸とPAMAMスター-バーストデンドリマーとの相互作用の特徴を評価した。これらのデンドリマーはアンモニア開始コアとN-(2-アミノエチル)アクリルアミドから誘導された反復単位から成っていた。完全(full)(アミン末端官能基)ジェネレーションのポリマーおよび半分(エステル末端基)ジェネレーションポリマーの両者を、この研究に含めた。この実験において使用したサリチル酸対スター-バーストデンドリマーの比は、完全ジェネレーションのポリマーについてほぼ1サリチル酸分子対1末端アミン官能基を生じた。半分ジェネレーションのポリマーの研究において、より高い分子量のポリマーについて変更を行なって同一の比を用いた。

実験は室温において平面の静止セル透析方法に従い実施した。スペクトラポル(SpectraPor)6膜(分子量のカットオフ=1000)によつて分離したスペクトル静止透析セル(半分のセルの体積、10ml)を、すべての実験において使用した。サリチル酸の移送は、適当なセル区画からのアリコートを取り出すことによって時間の関数として監視し、そしてHPLC分析により、296nmにおいてUV検出器を使用してアセイした【ポンツバク(Bondapak)C-18カラム、アセトニトリル/0.1モルのリン酸緩衝液(pH 3.2)の移動相を20:80(v/v)の比で溶離し、30ml/時間の流速に設定した】。

1mg/mlのサリチル酸および2.5mg/mlのスター-バーストポリマー

区画に入れたことにおいて、前の実験と異なった。共存体区画からのサリチル酸の損失を、前述のように監視した。この実験の結果を第9図に記載する。第9図において、遊離酸は-.-で表わし、そして酸+ジェネレーション4.0のデンドリマー、pH 8.0、は-△-で表わされている。

第9図に示すように、受容体区画中のサリチル酸と受容体区画中のスター-バーストポリマーとの平面の特徴はサリチル酸の対照の研究と異なる。pH 8における分子のイオン化特性に基づいて、ほぼ8~7%の相互作用が期待される。観測された相互作用の程度は4~5%程度であることが示される。観測されるより低いアソシエーションは、実験の選択性のため、あるいはより低いイオン電荷のためであろう。

この実験は、この系の連続相からのポリマーによる遊離サリチル酸の吸収または除去を示す。このタイプの作用は、分子の反応性の抑制を生ずることがあり、ポリマーに関連するキレート化のタイプの性質の可能性を示唆している。

エステル末端官能基を有する半分のジェネレーションのスター-バーストポリマー(G=4.5)とのpH 8.65におけるサリチル酸の相互作用の特徴を評価した。サリチル酸(1mg/ml)をスター-バーストポリマー(G=4.5)3.6mg/mlとpH 8.65において一緒にした。10mlのこの溶液を共存体区画に入れ、そして共存体区画からの移送を前述のように監視した。結果を第10図に記載する。第10図において、遊離酸は-.-で表わされ、そして酸+ポリマーは-○-で表わされている。

これらの実験の条件下に、第三アミン基はpH 8.65においてイオン

特表昭63-501876(22)

化しないので、電荷の相互作用が起こることは予測されない。第10回に示すように、ポリマー($G = 4.5$)の存在下のサリチル酸の損失は、造形の最初の10時間の間、サリチル酸の対照の研究のそれと事实上同一である。

この実施例において提供されたデータから、次の観察がなされる：

- (1) 完全ジェネレーションのPAMAMスターバーストポリマーは、サリチル酸の担体として機能する。
- (2) 完全ジェネレーションのPAMAMスターバーストポリマーは、サリチル酸について持続した解放官能性を有する。
- (3) 完全ジェネレーションのPAMAMスターバーストポリマーのサリチル酸組成質は、pHによってコントロール可能である。

実施例5

ナトリウムプロピオネット末端第6ジェネレーションのスターバーストポリアミドアミンによる鉄の多直キレート化の立証
ナトリウムプロピオネット末端第6ジェネレーションポリアミドアミン(アンモニアから開始した)(97.1mg, 2.45モル)を、1.5mlの脱イオン水中に溶解した。0.5mlの0.5NのHClを添加し、て、pHを8.3に減少した。塩化第二鉄を(0.5mlの0.1, 0.2モルの溶液、0.051ミリモル)を添加すると、淡褐色のゼラチン状沈殿を生成した。60°Cに0.5時間加熱すると、ゼラチン状沈殿は可溶性となり、均質なオレンジ色の溶液が形成した。この溶液をバイオゲル(Bioigel)P2アクリアミドゲル(10g, 2回)でろ過し、オレンジ色帶を単離した(ハログン化物を含有しない)。溶液を真空除去すると、生成物は

中で混合し、そして70°Cに4時間加熱した。深紅色に変わり、そしてロジウムの大部分は吸収された。末反応のロジウムをろ過によって除去了し、そして溶液を回転蒸発器で除去了した。形成した油はクロロホルムに可溶性であった。これをウェルで洗浄し、乾燥(MgSO₄)した後、溶媒を除去すると、赤色油(0.18g)が得られた。NMRスペクトルをCDCl₃中で記録し、キレート化スターバーストと非キレート化スターバーストとの間にほんのわずかの差が認められた。このCDCl₃の一部をエタノールで希釈し、次いでNaBH₄を添加すると、ロジウムの沈殿が生じた。RhCl₃・3H₂Oはクロロホルム中およびクロロホルムのスターバースト溶液中に不溶性であり、こうしてキレート化が確認される。

実施例7

スターバーストポリマーに対してキレート化したPdを含有する生成物の調製

3.5ジェネレーションのPAMAM(エステル末端、NH₂から開始した)(1.1g, 0.24ミリモル)を、搅拌しながらアセトニトリル(50ml)中に溶解した。塩化パラジウム(0.24g, 1.4ミリモル)を添加し、そしてこの溶液を70~75°C(水浴)に一夜加熱した。PdCl₂はスターバースト中に吸収された。溶液を除去した後、CDCl₃中のNMRは、キレート化が起こったことを確認した。CDCl₃溶液をエタノールで希釈し、そしてNaBH₄を添加すると、パラジウムが沈殿した。キレート化生成物(1.23g)は褐色油として単離された。

実施例8

酢酸イットリウムからのトランスキレート化(trans chelation)

表 IV

実験値	理論値		
	Na ₂ Fe ₂ (SB) ₂	Na ₂ Fe ₂ (H) ₂ (SB)	Na ₂ Fe ₂ (H) ₂ (SB)
Na 0.39, 0.24 (0.31, 0.1X)	0.25	0.31	0.38
Fe 3.14, 3.11 (3.12, 0.02X)	3.05	3.05	3.04
C 47.11	49.87	49.84	49.81
H 7.33	7.31	7.30	7.29
N 14.81	14.49	14.48	14.17
O -----	25.03	25.02	25.01
分子量	36632.23	36654.21	36375.18
SB=C ₁₁₁ H ₁₁₁ N ₃₃₃ O ₁₁₁			

これらの結果は、スターバーストデンドリマーの1モル当り20±2モルの第二鉄イオンのキレート化を確認する。

実施例6

スターバーストポリマー当り1ロジウム原子より多くを含有する生成物の調製
2.5ジェネレーションのPAMAM(エステル末端、NH₂から開始した)(0.18g, 0.087ミリモル)およびRhCl₃・3H₂O(0.08g, 0.3ミリモル)をジメチルホルムアミド(DMF)(1.5ml)

によるメチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンによる、イットリウムの多直キレート化の立証

スターバーストポリエチレンイミンメチレンカルボキシレート末端物質(0.46g, 52.5%活性、強部臭化ナトリウム、0.18ミリモルの活性スターバーストデンドリマー)、実施例PPから、を4.5mlの酢酸イットリウム中に溶解した。生じたpHは11.5~12であった。酢酸イットリウムの溶液は、酢酸イットリウム(0.15g, 0.5ミリモル)および酢酸ナトリウム(0.41g, 0.5ミリモル)を1.5mlの酢酸イットリウム中に溶解することによって調製した(デンドリマーの1モルにつき2.9モルのイットリウム)。酢酸イットリウムの0.5mlのアリコートをデンドリマー溶液に添加し、そして¹³C NMRスペクトルを75.5MHzにおいて記録した。

酢酸イットリウムの¹³C NMRスペクトルは、2つの共鳴、カルボキシル炭素について184.7ppmおよびメチル炭素について23.7ppmを示し、これに比較して酢酸ナトリウムについて182.1および24.1ppmおよび酢酸について177.7および20.7ppmを示す【サトラー(Sadtler)¹³C NMR標準スペクトラ】。これらのバンドの位置を監視すると、スターバーストデンドリマーとのキレート化の程度が示される。キレート化を指示するスターバーストデンドリマーについての最も有益なシグナルは α -CH₂(キレート化に脱化するメチレンカルボキシレート基の)であり、これはキレート化しないデンドリマーにおいて58.4ppmに現われ、そしてキレート化したデンドリマーにおいて63.8に現われる。イットリウムとキレート化すると、時間 α -CH₂

特表昭63-501876 (23)

のスピン格子緩和時間は、期待するように、 0.24 ± 0.01 秒から 0.14 ± 0.01 秒に短縮し、キレート化を指示する。

0.5mI の酢酸イットリウム溶液をスターバーストデンドリマーに添加した後、すべてのイットリウムはデンドリマーによってキレート化されるようと思われ、酢酸ナトリウムのそれである酢酸イットリウムのシグナルによって確認される。同一の観測は、酢酸イットリウム溶液の第2の 0.5mI のアリコートの添加によって認められた。酢酸イットリウムの第3のアリコートを添加すると、イットリウムのすべてはスターバーストのキレートとして吸収されることが確認されず、アセテートカルボキシル共鳴が 183.8ppm にシフトすることが観測され、イットリウムの一部が酢酸塩とアソシエーションすることが示された。デンドリマー上のキレート化-C_H-基の積分した面積は増加し、添加したイットリウムの第3モル当量の一部が事実デンドリマーとキレート化したことが示された。この結果が示すように、デンドリマーはデンドリマー分子の1つにつき2~3個のイットリウムイオンとキレート化することがある。

実施例9

酢酸イットリウムからのトランスキレート化(trans chelation)によるメチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリアミドアミンによる、イットリウムの多重キレート化の立証
実施例8において使用したと同一の実験方法を、この研究に使用した。スターバーストポリアミドアミンメチレンカルボキシレート末端物質(0.40g , 82.5%活性、残部臭化ナトリウム、 0.12ミリモル)を、 $4\sim5\text{mI}$ の酢酸ジュウテリウム中に溶解した。生ずるpH $11.5\sim$

12であり、これを実験前に 6N のHClで 9.4 に低下させた。酢酸イットリウムの溶液は、塩化イットリウム(0.1125g , 0.37ミリモル)および酢酸ナトリウム(0.0915g , 1.1ミリモル)を 1.5mI の酢酸ジュウテリウム中に溶解することによって調製し、こうして各 0.5mI の溶液は 1モル当量 の金属を含有した。

最初の 2モル当量 の添加した酢酸イットリウムを、スターバーストポリアミドアミンで完全にキレート化した。第3モル当量のイットリウムを添加したとき、生成物が沈殿し、そしてそれまではNMRのデータを得ることができなかった。スターバーストデンドリマーによるキレート化について最も有益な情報を与えるシグナルは、キレート化する直後に調換する2つの炭素のものであった。キレート化しないデンドリマーにおけるこれらの炭素の化学的シフトは、 $\alpha-\text{C}_\text{H}$ について 59.1ppm 、および主鎖の最初のメチレン炭素について 53.7ppm において起こった。キレート化すると、これらの2つの共鳴は、それぞれ、 80.8 および 55.1ppm にダウニフィールドにシフトすることが観測された。トランスキレート化は、デンドリマー分子につき2つの金属イオンが容易にキレート化されることを示すが、第3モル当量のある未知の分画がキレート化すると、生成物は溶液から沈殿する。

実施例10

メチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンによる ^{103}Y の多重キレート化の立証
塩化イットリウムの標準の溶液($3 \times 10^{-3}\text{モル}$ 、塩体を添加しない ^{103}Y をえた)およびメチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンの標準の溶液($6 \times 10^{-3}\text{モル}$)

を調製した。これらをHEPES緩衝液中で種々の金属：スターバースト比で一緒に反応させた。錯体の收率は、イオン交換クロマトグラフィーにより、セファデックス(Sephadex) G50イオン交換ビーズを使用し、 10% のNaCl:NH₄OH, 4:1, pH10.0で溶離することによって決定した。錯化しない金属はこのカラム上に除去され、錯化した金属は溶離する。收率は、ウェルカウンター(well counter)を使用して、溶離された放射能をカラム上のそれと比較することによって得た。

表 V

2.5ジェネレーションのPEIアセテートと ^{103}Y とのキレート化

体積Y:3	体積PEI	体積HEPES	M:L理論	X錯体	M:L酢酸塩
5	30	370	0.1	110	0.1
10	30	360	0.2	101	0.2
20	30	350	0.4	95	0.4
30	35	340	0.5	97	0.5
30	30	340	0.5	102	0.5
60	30	310	1.0	99	1.0
120	30	250	2.0	100	2.0
180	30	180	3.0	94	2.8
250	30	120	4.1	80	3.3
300	20	80	7.5	44	3.3
300	20	70	5.0	40	2.0
300	20	70	5.0	41	2.0

表Vにおける体積はマイクロリットルの単位である。

実験の精度の範囲内で、これらの結果が示すように、2.5ジェネレーションのスターバーストPEIアセテートはポリマー当たり2~3金属をキレート化して可溶性の錯体を形成する。

実施例11

4-イソチオシアナトフェニルメチレンカルボキシレート末端第2ジェネレーションのスターバーストポリエチレンイミンとIgGモノクローナル抗体とのコンジュゲーション

イソチオシアネート、 $1.0\text{ }\mu\text{g}$ ($50\text{ }\mu\text{l}$)、実施例DDから、モ、放射性標化インジウム- 111 を加えてある、 3 ミリモル の塩化インジウムの $500\text{ }\mu\text{l}$ 中に溶解し、そしてpHを $6.60\text{ }\mu\text{l}$ の 1 N のNaOHで9に調節した。次いで、金抗体IgG CC-48のアリコートをキレート化したスター-バーストのアリコートと混合した。次いで、この混合物を18時間振盪したまま放置した。次いで、この混合物をHPLC [カラム、デュポン、ゾルバクス・バイオスフェア (Zorbax Biosphere) GF-250; 溶離剤、 0.025 モル の酢酸ナトリウム、pH 6]および 254 nm においてUV検出器および放射能検出器によって分析した。結果を表V1に示す。

表V1
スター-バースト-IgGコンジュゲート

	1	2	3	4
IgG溶液 (μl)	20	20	20	20
キレート化スター-バースト溶液 (μl)	5	20	50	100
IgG上の放射能 %	6	5	5	3
コンジュゲーションしたIgG%	2	7	17	22

実施例12

4-イソチオシアナトフェニルメチレンカルボキシレート末端第3ジエキセレイションのスター-バーストポリエチレンイミンとIgGモノク

ローナル抗体とのコンジュゲーション

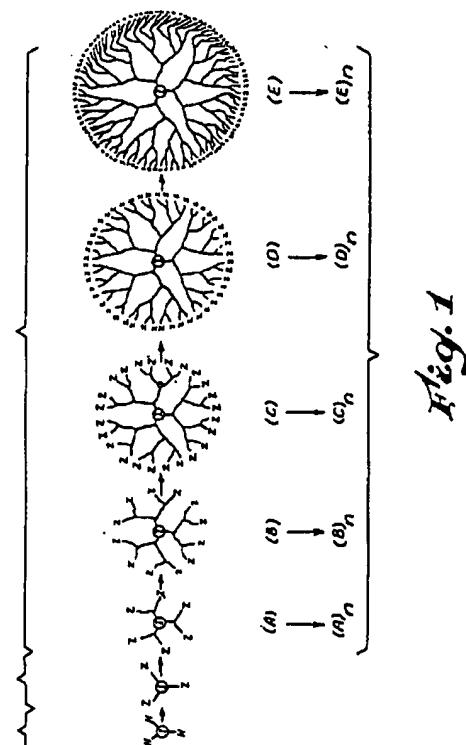
実施例DDからのイソチオシアネート、 $4\text{ }\mu\text{g}$ ($2.0\text{ }\mu\text{モル}$) を $200\text{ }\mu\text{l}$ の 3 ミリモル の塩化インジウム ($60\text{ }\mu\text{モル}$) と混合した。次いで、この溶液の $20\text{ }\mu\text{l}$ のアリコートに放射性標化インジウム- 111 を加え、そしてpHを $3.0\text{ }\mu\text{l}$ のNaOHおよび $1.0\text{ }\mu\text{l}$ の 0.1 M HCl の添加によって9に調節した。このインジウムキレートを、 $150\text{ }\mu\text{l}$ のCC-48金抗体IgG、 $1.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ と、 50 ミリモル のHEPES緩衝液中でpH 9.5において混合した。室温において18時間後、抗体を調製用HPLC [カラム、デュポン、ゾルバクス・バイオスフェア (Zorbax Biosphere) GF-250; 溶離剤、 0.025 モル の酢酸ナトリウム、pH 6]；および 254 nm におけるUV検出器および放射能検出器によって回収した。回収した抗体をアミコン膜上で濃縮し、そしてPBS緩衝液中にpH 7.4において交換した。回収された抗体はほぼ $0.5\text{ }\mu\text{ci}/100\text{ }\mu\text{g}$ の比活性を有した。

実施例13

 ^{111}In 標識スター-バースト抗体コンジュゲートの生体内局在化

実施例12において調製した標識スター-バースト抗体コンジュゲートの有用性は、無胸腺症のマウスにおけるヒト腫瘍異種移植片による、この物質の吸収を測定することによって立証された。マウスの無胸腺症のマウスに、ヒト結腸癌細胞系、LS-174T (ほぼ 4×10^6 細胞/動物) を皮下的に接種した。接種後ほぼ2週に、各動物の尾の静脈を経て注射した。マウスは17および48時間後に殺し (各時点において5匹の動物)、臓器および選択した組織を切取し、秤量し、そして放射能をガンマ線カウンターで測定した。17時間後、組織 1 g につき注射した

投与量の 13.5% が腫瘍に局在化していた。48時間後、組織 1 g につき注射した投与量の 21.6% が腫瘍に局在化していた。



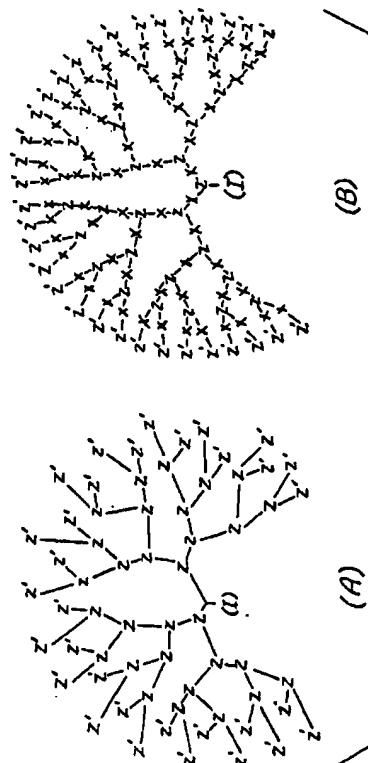


Fig. 2.

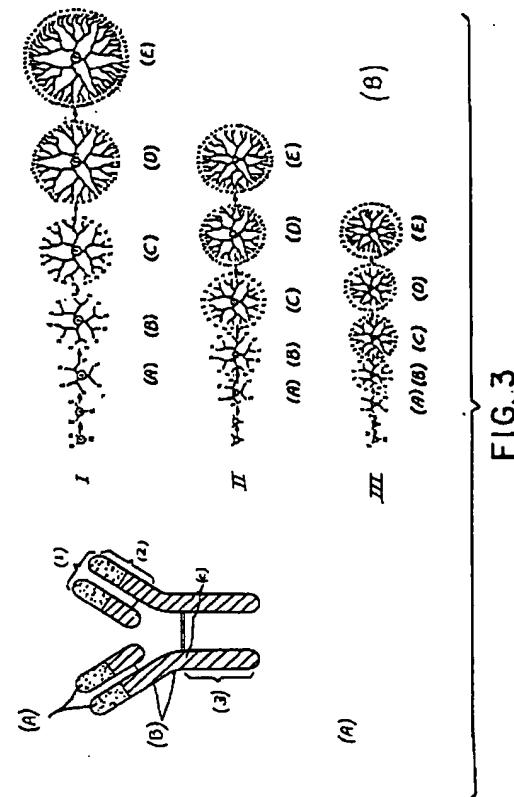


FIG. 3

FIG. 4

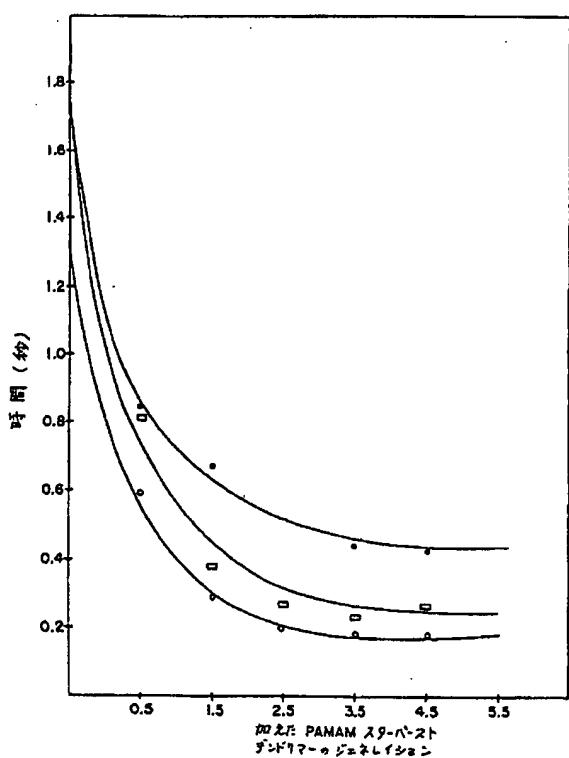


FIG. 5

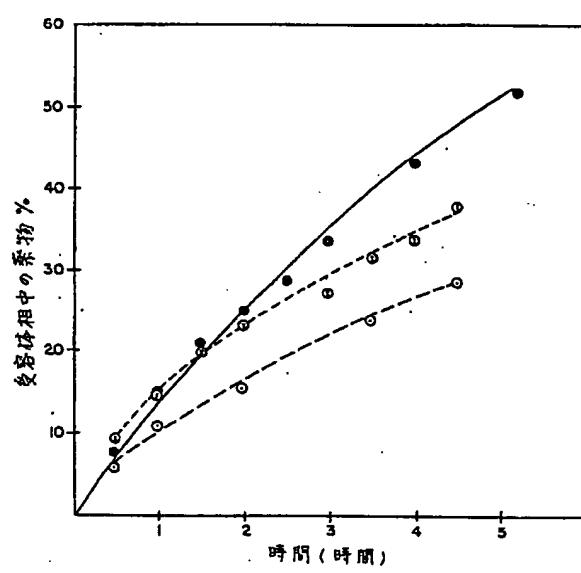


FIG. 6

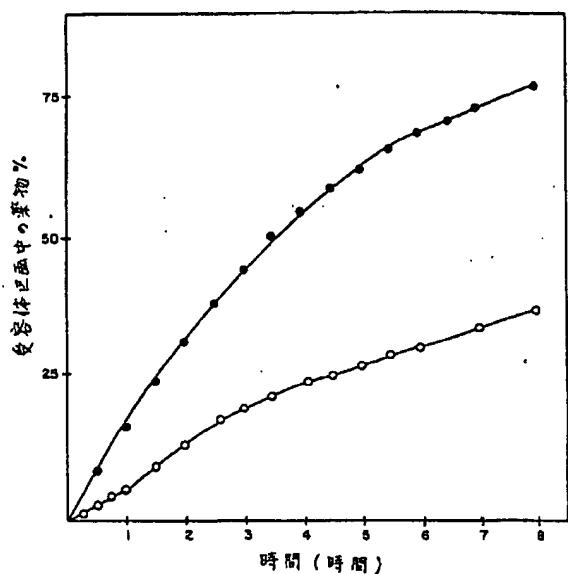


FIG. 7

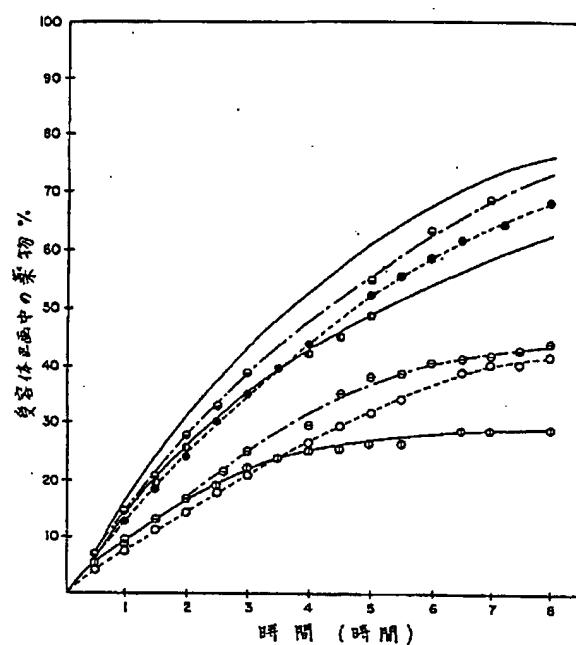


FIG. 8

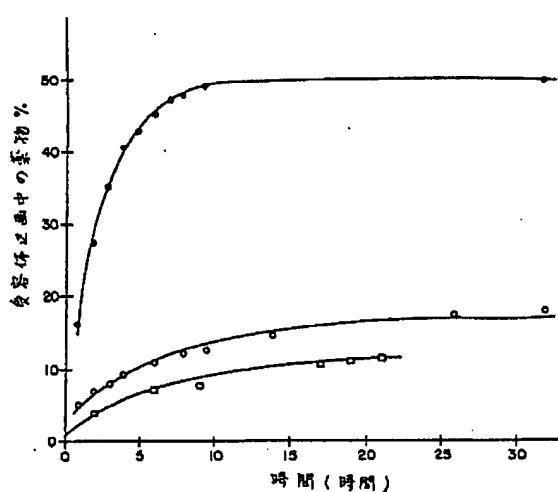
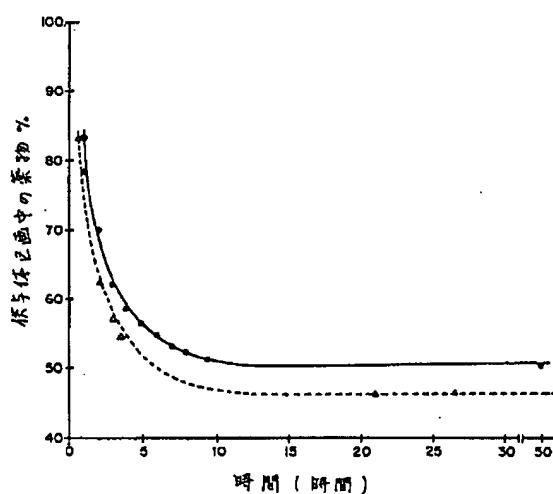


FIG. 9



昭和63年4月18日

特許庁長官 小川邦夫 聖

1. 特許出願の表示

EPO-605281

PCT/US87/02074

2. 発明の名称

スターバーストコンジュゲート

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・
アボットロード・ダウセンター2030

名称 ザ・ダウ・ケミカル・カンパニー

4. 代理人 T107

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自動車会館

氏名 (6078)弁理士 小田島平吉

電話 585-2256



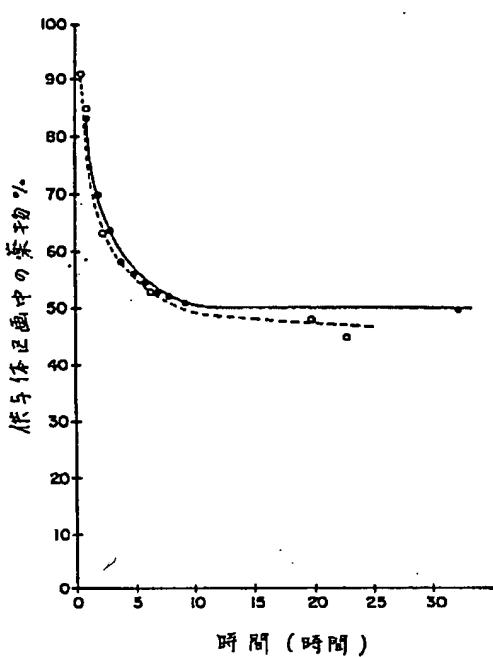
5. 補正書の提出年月日

1988年1月8日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通



補正請求の範囲

1、少なくとも1単位の少なくとも1種の担持された製薬学的物質とアソシエーションして少なくとも1種のスターバーストポリマーを含むなるスターバーストコンジュゲート。

2、前記スターバーストポリマーはスターバーストデンドリマーである請求の範囲第1項記載のコンジュゲート。

3、前記少なくとも1種の担持された製薬学的物質は、蛋白質、放射性抗原、キレート剤、キレート化金属、トキシン、抗体、抗体断片、抗原、シグナル発生因子、シグナル反応因子、またはシグナル吸収因子である請求の範囲第1または2項記載のコンジュゲート。

4、少なくとも2種の異なる担持された物質が存在し、それらの少なくとも1種は標的ディレクターであり、そしてそれらの少なくとも1種は生物活性因子である請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。

5、前記標的ディレクターは1種または2種以上の標的レセプターに對して特異的である実在因子であり、そして前記生物活性因子は放射性抗原、蛋白質、またはトキシンである請求の範囲第4項記載のコンジュゲート。

23、前記除去部分は、キレート剤、抗体または抗体である請求の範囲第2項記載の方法。

24、式

$$[(T)_e - (C')_f]_g * (P)_x * [(C'')_h - (M)_y]_k$$

(III)

式中、

各C'は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

各C''は同一もしくは相異なる結合基を表わし、

gおよびhの各々は個々に1またはそれより大きい整数を表わし、

fおよびiの各々は個々に0またはそれより大きい整数を表わし、

-は結合基が存在する場合共有結合を示し、

各Pはデンドリマーを表わし、

xは1またはそれより大きい整数を表わし、

Tは標的ディレクターを表わし、

各Mは担持された製薬学的物質の単位(例えば、分子、原子、イオンおよび/または他の基本単位)を表わし、前記担持された製薬学的物質は同一の担持された製薬学的物質または異なる担持された物質であることができ、好ましくは前記担持された製薬学的物質は生物活性因子であり、

yは1またはそれより大きい整数を表わし、そして

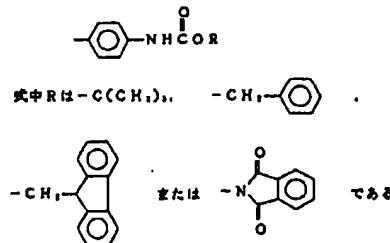
*は前記担持された製薬学的物質が前記デンドリマーとアソシエーションしていることを示す、

のスターバーストコンジュゲートを調製する方法であって、反応性部分を有するPを、保護されたNH₂基をもつことができる、結合基、例えば、アミニン部分と反応させることを含んでなる前記方法。

25、反応性部分を有するPを、保護されたNH₂基をもつことができる、結合基、例えば、アミニン部分と反応させることを含んでなる請求の範囲第1項記載のスターバーストコンジュゲートを調製する方法。

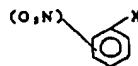
26、前記保護基は、式

式中、コアは末端基の#／回枝状の枝



を有する請求の範囲第25項記載の方法。

27、R は、また、式

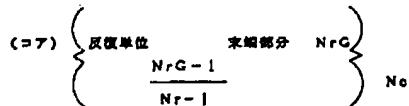


式中、n は 1 または 2 であり、そして X は F、Cl、Br、I、SO₃、C(=O) であり、そして n が 1 であるとき、NO₂ 基はパラ位置に存在する、の取り付けた結合基（ハンドル）を有する請求の範囲第25項記載の方法。

28、前記結合基は 4-フルオロニトロベンゼンである請求の範囲第

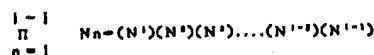
27項記載の方法。

29、前記スター-バーストコンジュゲートは、式



①

に結合した官能基を表わし、そして Nc はコアの原子価を表わし、反復単位は式 $X^{i-1}Y^{i-1}(Z^{i-1})N^{i-1}$ によって表わされ、ここで「i」は上に定義した通りであり、最後のすなはち末端の単位は式 $X^1Y^1(Z^1)N^1$ によって表わされ、ここでは末端のジェネレイションを表わし、そして X^1, Y^1, Z^1 や N^1 は X^1, Y^1, Z^1 や N^1 と同一であるあるいは異なることができ、ただし Z^1 基は結合した連続するジェネレイションは存在せず、そして N^1 は 2 より小さいことができ、n 官能基はその定義した限界の間のすべての値の範、例えば、



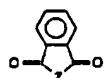
であり、これは反復単位、 $X^{i-1}Y^{i-1}(Z^{i-1})N^{i-1}$ の数であり、前記反復単位は 1 つの樹枝状の枝のそのジェネレイションを含み、そして 1 が 1 であるとき、n = 1

 $n = 1$

である。

を有する請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。

31、反応性部分を有する P を、式

の N-furylimidyl によって保護された NH₂ 基をもつことができる、

$$\frac{NrG}{2}$$

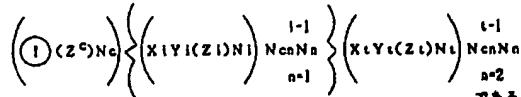
であり、G はジェネレイションの数であり、Nr は少なくとも 2 である反復単位の多度であり、Nc はコア化合物の原子価であり、末端部分は次式によって決定される：

$$\frac{NcNrG}{2}$$

式中、Nr、G および Nc は上に定義した通りであり、そして反復単位は $Nr+1$ の原子価または官能価を有し、ここで Nr は上に定義した通りである。

を有する請求の範囲第2項記載のコンジュゲート。

30、前記スター-バーストコンジュゲートは、式



式中 i は [−i] であり、そしてコアの化合物は式



で表わされ、ここで

①

はコアを表わし、Z^c は

アニリン部分と反応させることを含んでなる請求の範囲第1項記載のスター-バーストコンジュゲートを調製する方法。

32、反応性部分を有する P を、スター-バーストの合成に使用する条件下で不活性であるアミンについて使用する保護基によって保護された NH₂ 基をもつことができる、アニリン部分と反応させることを含んでなる請求の範囲第1項記載のスター-バーストコンジュゲートを調製する方法。

33、スター-バーストポリエチレンイミンメタンスルホンアミドを基盤と反応させることを含んでなるスター-バーストポリエチレンイミンを調製する方法。

34、膜を使用する限りろ過によって被膜を除去することを含んでなる存在する被膜を有するスター-バーストデンドリマーを調製する方法。

35、前記被膜はエチレンジアミンである請求の範囲第34項記載の方法。

36、ランタニドをスター-バーストポリエチレンイミンアセテートとキレート化することを含んでなる、前記スター-バーストポリマーがスター-バーストデンドリマーであり、そして前記粗精制された物質がランタニドである請求の範囲第1項記載のスター-バーストコンジュゲートを調製する方法。

)

特表昭63-501876 (28)

国際特許報告													
International Application No. PCT/US 97/02074													
<p>C. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER OF INVENTION (Indicate here, if possible, up to 10) According to International Patent Classification (IPC) or its local National Classification and IPC INT. CL. N° A61K 49/02 U.S. CL. 626/1.1</p> <p>G. FIELDS SEARCHED</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="padding: 2px;">Invention Document(s) Searched *</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Classification by IPC</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px; vertical-align: top;"> 42A/1.1.9 U.S. 42A/10, 816, 418, 441 42A/10, 312, 350, 361, 392 <small>Determination: Specified other than ultimate Concentration to the Extent that such Determination are indicated in the Fields Searched</small> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Classification Symbols</td> </tr> </table>		Invention Document(s) Searched *	Classification by IPC	42A/1.1.9 U.S. 42A/10, 816, 418, 441 42A/10, 312, 350, 361, 392 <small>Determination: Specified other than ultimate Concentration to the Extent that such Determination are indicated in the Fields Searched</small>	Classification Symbols								
Invention Document(s) Searched *													
Classification by IPC													
42A/1.1.9 U.S. 42A/10, 816, 418, 441 42A/10, 312, 350, 361, 392 <small>Determination: Specified other than ultimate Concentration to the Extent that such Determination are indicated in the Fields Searched</small>													
Classification Symbols													
<p>H. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category</th> <th style="width: 80%;">Classification of Document, ** and Subjective, Briefly Materialed, of the relevant document</th> <th style="width: 10%;">Reference to Claim No. **</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>US. A. 4,558,120 PUBLISHED 10 DECEMBER 1995 TONALIA ET AL</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>P,A</td> <td>US. A. 4,606,907 PUBLISHED 19 AUGUST 1995 JIMON ET AL</td> <td>1-27</td> </tr> <tr> <td>T</td> <td>US. A. 4,696,064 PUBLISHED 15 SEPTEMBER 1992 TONALIA ET AL</td> <td>1-27</td> </tr> </tbody> </table>		Category	Classification of Document, ** and Subjective, Briefly Materialed, of the relevant document	Reference to Claim No. **	A	US. A. 4,558,120 PUBLISHED 10 DECEMBER 1995 TONALIA ET AL	1-27	P,A	US. A. 4,606,907 PUBLISHED 19 AUGUST 1995 JIMON ET AL	1-27	T	US. A. 4,696,064 PUBLISHED 15 SEPTEMBER 1992 TONALIA ET AL	1-27
Category	Classification of Document, ** and Subjective, Briefly Materialed, of the relevant document	Reference to Claim No. **											
A	US. A. 4,558,120 PUBLISHED 10 DECEMBER 1995 TONALIA ET AL	1-27											
P,A	US. A. 4,606,907 PUBLISHED 19 AUGUST 1995 JIMON ET AL	1-27											
T	US. A. 4,696,064 PUBLISHED 15 SEPTEMBER 1992 TONALIA ET AL	1-27											
<p>* Specific description of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not essential to the present invention. "B" document containing information not pertinent to the invention. "C" document which may throw doubts on validity of another document. "D" document which relates to a subject different from the present invention but which is cited in connection therewith in order to explain the background of the present invention. "E" document relating to an end product, use, exhibition or other results. "F" document published later than the international filing date but earlier than the priority date. "G" document member of the same patent family.</p> <p>** Invention document published after the international filing date and containing any and all the disclosure of any document which may be considered prior art.</p> <p>** Description of apparatus references the claimed invention cannot be considered prior art or cannot be considered as prior art.</p> <p>** Description of method references the claimed invention cannot be considered prior art or cannot be considered as prior art.</p> <p>** Description of material references the claimed invention cannot be considered prior art or cannot be considered as prior art.</p> <p>** Description of composition references the claimed invention cannot be considered prior art or cannot be considered as prior art.</p> <p>** Description of process references the claimed invention cannot be considered prior art or cannot be considered as prior art.</p> <p>** Description of apparatus, method, material or composition references the claimed invention cannot be considered prior art or cannot be considered as prior art.</p>													
<p>IV. CERTIFICATION</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Date of the ASPT Completion of the International Search 29 OCTOBER 1997</td> <td>Date of Filing of this International Search Report 24 NOV 1997</td> </tr> <tr> <td>International Searching Authority: ISA/US</td> <td>Signature of Accepting Officer John Madras</td> </tr> </table>		Date of the ASPT Completion of the International Search 29 OCTOBER 1997	Date of Filing of this International Search Report 24 NOV 1997	International Searching Authority: ISA/US	Signature of Accepting Officer John Madras								
Date of the ASPT Completion of the International Search 29 OCTOBER 1997	Date of Filing of this International Search Report 24 NOV 1997												
International Searching Authority: ISA/US	Signature of Accepting Officer John Madras												

Form PCT/ISA/10 (second sheet) (May 1994)

第1頁の続き

- ②発明者 チエン, ロバータ・シー
- ②発明者 トムリンソン, イアン・エイ
- ②発明者 ファジオ, マイケル・ジェイ
- ②発明者 ヘッドストランド, デビッド・エム

アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・オールドバイントル
イル3873
アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・バーチフィールドド
ライブ3316
アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・フォレストビュード
ライブ4617
アメリカ合衆国ミシガン州48640ミドランド・ウエストチツベワリ
バーロード506



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Publication number:

0 271 180
A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: 87307266.4

(51) Int. Cl.4: **A61K 47/00 , A01N 25/10**

(22) Date of filing: 17.08.87

(30) Priority: 18.08.86 US 897455

(43) Date of publication of application:
15.06.88 Bulletin 88/24

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Applicant: THE DOW CHEMICAL COMPANY
2030 Dow Center Abbott Road P.O. Box 1967
Midland, MI 48640(US)

(72) Inventor: Tomalla, Donald A.
463 West Chippewa River Road
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: Kaplan, Donald A.
919 East Park Drive
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: Kruper, William J.
230 Barden Road
Sanford Michigan 48657(US)
Inventor: Cheng, Roberta C.
3873 Old Pine Trail
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: Tomlinson, Ian A.
3316 Birchfield Drive
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: Fazio, Michael J.
4617 Forestview Drive
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: Wilson, Larry R.
550 Eight Mile Road
Midland Michigan 48640(US)
Inventor: Hedstrand, David M.
506 West Chippewa River Road
Midland Michigan 48640(US)

(24) Representative: Burford, Anthony Frederick et al
W.H. Beck, Greener & Co. 7 Stone Buildings
Lincoln's Inn
London WC2A 3SZ(GB)

180 A1

(54) Starburst conjugates.

(57) Starburst conjugates which are composed of at least one dendrimer in association with at least one unit of a carried agricultural, pharmaceutical, or other material have been prepared. These conjugates have particularly advantageous properties due to the unique characteristics of the dendrimer.

EP 0 271